

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології та
репродуктивної медицини

Завідувач кафедри:

д.б.н., проф. Микола ДЗЕРЖИНСЬКИЙ

Протокол № _____ засідання кафедри

від “ _____ ” _____ 2023 р.

**АНАЛІЗ ПРОЛІФЕРАТИВНОГО СТАТУСУ НОВОУТВОРЕНЬ
МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ У ПАЦІЄНТОК ІЗ РІЗНИМ КЛІНІЧНИМ
ПРОФІЛЕМ**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 «Біологія»
Козловської Катерини Ігорівни

Науковий керівник від кафедри:
канд. біол. наук, доцент
Скрипник Наталія Вячеславівна

Робота виконана під керівництвом завідувача лабораторії механізмів
медикаментозної резистентності Інституту експериментальної патології,
онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, доктора біологічних
наук Лук'янової Наталії Юріївни

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

PMЗ – рак молочної залози

ІГХ – імуногістохімія

ER – Estrogen receptor (Естрогеновий рецептор)

PR – Progesterone receptor (Рецептор прогестерону)

HER2 – Human epidermal growth factor receptor 2 (Рецептор людського епідермального фактору росту 2)

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1.	6
1.1. Гістофізіологія молочної залози.....	6
1.2. Епідеміологія, фізіологія, діагностика та терапія раку молочної залози.....	7
1.3. Репродуктивний статус та РМЗ.....	21
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи дослідження	23
2.1. Клініко патологічні характеристики пацієнтів.....	23
2.2. Морфологічне дослідження операційного матеріалу.....	24
2.3. Визначення молекулярних підтипів РМЗ за допомогою імуногістохімічного методу.....	25
2.4. Біоінформатичні методи досліджень.....	27
2.5. Статистичні методи досліджень.....	28
РОЗДІЛ 3. Результати та їх обговорення	29
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	41

ВСТУП

Показники захворюваності на рак молочної залози (РМЗ) найвищі серед усіх онкологічних захворювань жінок у світі (за виключенням раку шкіри). Щороку у світі понад 1,6 мільйона жінок захворюють на РМЗ і більше ніж 500 тис. з них помирають від цієї пухлини [1]. За даними Національного канцер-реєстру №18 за 2018-2019 рр. в Україні питома вага раку молочної залози в структурі захворюваності на злоякісні новоутворення складає 20,6% (перше місце серед жінок). Аналогічний показник (20,5%) мають злоякісні новоутворення молочної залози в структурі смертності від злоякісних новоутворень [2]. За даними Національного інституту раку США, у близько 12% жінок серед загальної популяції розвинеться рак молочної залози протягом життя [3].

Результати лікування РМЗ залежать від різноманітних факторів. Прогрес у лікуванні РМЗ пов'язують з верифікацією пухлини не тільки на гістологічному, а і на молекулярно-біологічному рівні. Класифікація лише за формальними морфологічними ознаками, яка використовувалась ще декілька десятиліть тому назад, залишала багато запитань для клініцистів.

Справжнім проривом в лікуванні РМЗ стала робота Пероу [4], яка дозволила класифікувати рак молочної залози (РМЗ) за допомогою профілювання експресії генів. Таким чином було виділено 4 основні на сьогодні молекулярні підгрупи РМЗ: люмінальний А, люмінальний В, з ампліфікацією HER2/neu та базальноподібний.

Проліферативний статус новоутворень визначає потенціал трансформованих клітин до поділу і, відповідно, свідчить про потенціал новоутворення до росту та прогресії РМЗ. Про проліферативний статус новоутворення свідчить рівень експресії гену *MKI67*, і власне кількість продукту цього гену – Ki-67 в клітині.

РМЗ у жінок може впливати на їх репродуктивний статус, особливо якщо вони проходять лікування. Лікування РМЗ може включати хірургічне видалення ураженої ділянки молочної залози, радіотерапію та хіміотерапію.

Ці методи можуть мати вплив на функцію яєчників та гормональний фон жінки, що може призвести до порушень репродуктивної функції.

Залежно від типу та стадії РМЗ, лікар може порекомендувати збереження фертильності перед початком лікування. Це може включати заморожування яйцеклітин або зародків, використання інгібіторів гонадотропіну або інші методи. Таким чином, РМЗ може впливати на репродуктивний статус жінок, і тому важливо обговорити ці питання зі своїм лікарем перед початком лікування.

Крім того, РМЗ може впливати на емоційний стан жінки та її партнера, що може відбитись на статевих відносинах та бажанні мати дітей. Для підтримки психологічного стану жінок, які пройшли лікування раку молочної залози, можуть запропонувати консультування психолога, групову підтримку та інші форми допомоги.

Достеменно не відомо про особливості змін проліферативного потенціалу пацієнток та власне залежності від їх репродуктивного статусу. Відповідно, метою роботи стало: дослідження проліферативного статусу новоутворень молочної залози у пацієнток із різним клінічним статусом.

РОЗДІЛ 1

1.1. Гістофізіологія молочної залози

Молочна залоза (*glandula mammaria*) - це складна структура, яка складається зі змішаної залозистої та жирової тканини. Жировий компонент займає велику частину залози та слугує для зберігання енергії та забезпечення її захисту. Залозиста тканина включає молочні протоки та залози, які виробляють молоко [5].

Молочна залоза зазвичай має форму конуса та розташована в грудній клітці, за грудинним відростком. У жінок молочна залоза складається з 15-20 дольок, кожна з яких містить окрему протоку. Протоки збирають молоко з дольок та переносять його до соска через молочні протоки молочної залози.

Кожна долька молочної залози містить клітини, які виробляють молоко - glandelociti. Ці клітини збираються в окремі групи, які називаються альвеолами. Альвеоли знаходяться у кластерах, які називають молочними лопатями. Ці лопаті з'єднуються з молочними протоками та забезпечують відповідну транспортну систему для молока.

Молочна залоза оточена фіброзною капсулою, яка складається зі сполучної тканини. Фіброзна капсула також з'єднує молочну залозу з оточуючими тканинами та органами. Крім того, молочна залоза має мережу кровоносних судин та нервів, які забезпечують її необхідним живлення та іннервацією для функціонування залози [6].

Молочна залоза є важливою частиною репродуктивної системи жінок, яка відповідає за вироблення молока для вигодовування немовляти. Фізіологія молочної залози включає різноманітні процеси, які забезпечують продукцію молока, його транспортування та вивільнення.

Одним з ключових процесів в фізіології молочної залози є синтез та секреція молока. Вона починається з другого дня після пологів у результаті складних рефлексорних і гормональних впливів. Процес утворення молока

регулюється нервовою системою і лактогенними (пролактин, лютеотропний гормон) гормонами гіпофіза, дія яких починається після припинення впливу плаценти, що на кінець вагітності є основним виробником фолікулярного гормону. Пролактин викликає секрецію молока після підготовки паренхіми молочної залози в період вагітності естрогенами (розвиток вивідних проток) і прогестероном (проліферація в альвеолах) [7]. Доведено, що стимулюючий вплив мають гормони щитоподібної і надниркових залоз. Функція молочної залози значною мірою залежить від рефлексорних впливів, акту смоктання, що викликає посилення секреції молока.

Як вторинний статевий орган, молочна залоза є гормонозалежною. Як нормальні, так і злоякісні клітини є високочутливими до дії стероїдних гормонів, особливо естрогену, прогестерону і андрогенів. Дія гормонів передається через естрогенові і прогестеронові рецептори [8]. Вважають, що естрогени стимулюють проліферацію епітелію проток, тоді як прогестерон відповідає за часточково-альвеолярний ріст.

Інший важливий процес в фізіології молочної залози - це транспортування молока до місця виведення. Молоко виробляється в молочних залозах і збирається у молочних протоках. Звуження м'язів молочних протоків допомагає переносити молоко через залозу до сосків.

1.2. Епідеміологія, фізіологія, діагностика та терапія раку молочної залози

РМЗ – злоякісна пухлина залозистої тканини молочної залози. Проблема раку молочної залози є однією з найбільш актуальних в сучасній онкології, так як це захворювання є найпоширенішим серед жіночої популяції. Також це друге за частотою після раку легень онкологічне захворювання в популяції взагалі (враховуючи чоловіче населення).

Злоякісні новоутворення є однією з найважливіших проблем сучасності. За даними Всесвітньої Організацією Охорони Здоров'я (ВООЗ), у світі щороку реєструється 1,1 млн. нових випадків захворювання [9]. Щорічно у світі від РМЗ вмирає 41 тисяча жінок. Найбільший показник смертності на 100 тис. населення є в Англії - 36,0, на Мальті - 35,5, а також у Данії - 34,5. Найнижча смертність відмічалась у Перу - 5,6, в Японії - 6,7 та в Еквадорі - 6,5 на 100 тис. населення [10].

Серед жіночого населення України РМЗ посідає одне з лідируючих місць в загальній структурі як захворюваності, так і смертності від онкології за останні 10 років. РМЗ займає перше місце серед усіх локалізацій злоякісних пухлин у жінок (30% випадків захворюваності і 16-18% смертності серед новоутворень усіх можливих локалізацій).

Щорічно в Україні реєструється понад 16 тис. нових випадків РМЗ, з них 24,5 % складають жінки репродуктивного віку. Щороку помирає понад 7,8 тис. жінок, з них понад 20 % – в репродуктивному віці. Рівень захворюваності на РМЗ за останні 30 років зріс в 2,5 рази, щорічний приріст при цьому складає 7,1 %. Україна за показниками захворюваності на РМЗ посідає 5 місце у світі; вони становлять 64,5 на 100 тис. жіночого населення. кожні 35-37 хвилин виявляється новий випадок захворювання та щогодини від РМЗ помирає одна жінка. Пікових значень рівень захворюваності на РМЗ набуває у віковому проміжку 55-59 та 70-74 років.

До групи високого ризику належать насамперед особи з поєднанням певних генетичних та фенотипічних факторів, однак перш за все – це особливості стилю життя.

Деякі з етіологічних чинників, які можуть призводити до розвитку раку молочної залози, включають [11] :

1. Генетична схильність: наявність певних генетичних мутацій може підвищувати ризик розвитку раку молочної залози. Наприклад, жінки, у яких є мутації генів *BRCA1* або *BRCA2*, мають підвищений ризик розвитку раку молочної залози.

2. Вік: ризик розвитку раку молочної залози збільшується з віком. Більшість випадків раку молочної залози діагностуються у жінок старше 50 років.

3. Харчування: високий рівень споживання насичених жирів та алкогольних напоїв може збільшити ризик.

4. Ожиріння: високий рівень жирової тканини може збільшити ризик розвитку раку молочної залози.

5. Естрогени: довготривалий вплив естрогенів може збільшувати ризик розвитку раку молочної залози. Жінки, які рано починали менструальний цикл, або мали пізню менопаузу, можуть бути більш схильні до розвитку раку молочної залози через збільшену продукцію естрогенів.

6. Персональна медична історія: Історія попередніх захворювань на рак молочної залози або деяких інших видів раку, цукровий діабет, гіпертонічна хвороба або наявність доброякісних пухлин можуть збільшувати ризик розвитку раку молочної залози.

Сьогодні в клінічній практиці існує декілька типів класифікації які опираються на оцінку різних параметрів новоутворення. Клінічна класифікація злоякісних пухлин визначає її розмір і ступінь розповсюдження, наявність метастазів в різних групах лімфатичних вузлів та віддалених органах. Стадії розвитку злоякісних пухлин [12] :

I стадія - пухлина розміром до 1 см, не проростає глибше стінки органу, метастази відсутні.

II стадія - порівняно невелика пухлина діаметром понад 2 см, може проростати в стінку органу, але не виходить за межі органу, можлива наявність поодиноких рухомих метастазів в регіонарних лімфовузлах.

III стадія - пухлина діаметром понад 5 см, що проростає всі шари стінки органу, розпад пухлини, обмежена рухомість органу, багаточисельні метастази в регіонарні лімфатичні вузли.

IV стадія - пухлина будь-якого розміру з віддаленими метастазами або глибоким проростанням у сусідні органи і тканини.

Стадіювання пухлини - це процес оцінки розміру, розповсюдження та потенційної агресивності пухлини в організмі.

Оцінка розміру пухлини допомагає встановити її межі та з'ясувати, чи впливає вона на функціонування навколишніх тканин та органів. Розповсюдження пухлини допомагає визначити, наскільки вона захопила сусідні органи та тканини, що може впливати на обсяг можливих хірургічних втручань. Потенційна агресивність пухлини допомагає визначити швидкість її росту та можливість метастазування, що важливо для планування лікування та передбачення прогнозу для пацієнта.

Після стадіювання пухлини лікарі можуть вибрати оптимальний метод лікування та дати прогноз про можливість повного видужання та тривалість лікування.

Враховуються мінімум три чинники, котрі характеризують новоутворення: розмір основного вузла, ураження прилеглих лімфатичних вузлів та метастазування. Це – так звана класифікація TNM, її застосовують у клінічній онкології всього світу [13, 14] .

Tumor – характеристика головного пухлинного вузла. Залежно від типу раку оцінюють глибину проростання новоутворення, його площу, об'єм.

Tx - первинна пухлина не може бути визначеною.

T0 - немає ознак первинної пухлини.

Tis - карцинома in situ (лат. carcinoma in situ — рак на місці).

T1-T4 – різноманітні показники розміру, глибини проростання, об'єму знайденого новоутворення. В окремих випадках ще виділяють підкатегорії T1a, T2b та інші.

Nodus – ураження пухлинними клітинами регіонарних лімфатичних вузлів. Перші відсіви злоякісних клітин, метастази, потрапляють саме в лімфовузли, найбільш наближені до хворої ділянки.

Nx - регіонарні лімфовузли не можуть бути визначеними (наприклад, вже були попередньо видалені).

N0 - лімфатичні вузли не уражені метастазами.

N1-N3 - регіонарна лімфоїдна тканина уражена злоякісними клітинами (цифра біля N характеризує ступінь ураження л/в.).

Metastasis – віддалені метастази. Наприклад, у разі злоякісного ураження прямої кишки, це можуть бути відсіви в печінку.

Mx - віддалені метастази не можуть бути визначеними.

M0 - немає віддалених метастазів.

M1 - віддалені метастази.

Критерій G (grade) визначається гістологічно, за результатами біопсії або вивчення тканин, видалених під час операції. Він свідчить про ступінь диференціації пухлинних клітин:

GX – неможливо встановити ступінь диференціювання клітин;

G1 – високий ступінь диференціації;

G2 – помірний ступіть диференціації;

G3 – низький ступінь диференціації;

G4 – недиференційовані клітини, діляться вкрай швидко, повністю втратили ознаки здорових клітин, а разом із ними – і чутливість до будь-яких чинників, котрі регулюють розмноження.

Чим нижчий ступінь диференціювання, тим швидше перша стадія раку перейде в наступну, тим швидше з'являться метастази й тим гірше захворювання буде піддаватися хімієтерапії.

На сьогодні існує сучасна медична техніка, яка дозволяє верифікувати діагноз раку молочної залози і встановити стадію захворювання [15, 16]. Діагностика раку молочної залози базується на клінічних даних (огляд, пальпація) і даних додаткових методів обстеження:

- рентгенологічного;
- морфологічного;
- ультразвукового;
- термографічного;
- радіонуклідного;

–нових методів (цифрова мамографія, комп'ютерна томографія, ядерно-магнітно-резонансна томографія, позитронно-емісійна томографія).

Клінічну діагностику раку молочної залози зазвичай починають з огляду та пальпації. Під час огляду звертають увагу на зовнішні прояви хвороби, такі як деформація, пухлини, синдром «площинки», розпад пухлини та виділення з пухлин. Під час пальпації досліджують зморшки, умбілікацію та зміщення соска. Для раку молочної залози характерний позитивний симптом Кеніга, що означає, що пухлину можна відчуту як у стоячому, так і в лежачому положенні. Інструментальні методи діагностики, такі як мамографія та УЗД, також можуть допомогти у виявленні пухлин. Перед початком лікування обов'язково проводять біопсію пухлини для отримання гістологічних даних. У разі підозри на віддалені метастази застосовуються рентгенологічні та ізотопні дослідження.

Біохімічні показники крові, такі як лужна фосфатаза, трансамінази, Ca^{2+} , креатинин, лактатдегідрогеназа, а також пухлинні маркери CA15.3 та РЕА можуть свідчити про активність процесу, але їх підвищений вміст у крові має діагностичне значення лише на етапі первинної діагностики.

Для скринінгу раку молочної залози використовують мамографію [17], ультразвукове обстеження, лікарське обстеження та самообстеження. Групи ризику формуються для підвищення ефективності скринінгу.

Рання діагностика раку молочних залоз здійснюється за допомогою мамографії, що дозволяє виявити патологію на більш ранніх стадіях і зменшити смертність, проте не впливає на частоту захворюваності. Згідно з рекомендаціями Американського товариства з боротьби з раком, мамографію слід проводити щорічно з 40 років. Ультразвукове обстеження рекомендується як частина лікарського обстеження від 20-30 років та в профілактичних оглядах один раз на три роки, якщо не має показань для більш частого обстеження. Після 40 років рекомендується проводити щорічне ультразвукове обстеження, перед мамографією. Наразі немає доказів впливу лікарського обстеження молочних залоз на смертність від раку

молочних залоз. Хоча самообстеження рекомендується, не доведено, що воно впливає на своєчасне виявлення раку молочної залози. Жінкам з високим ризиком раку молочної залози рекомендується проводити обстеження раніше та частіше.

Самообстеження, яке проводиться один раз на місяць, є додатковим методом виявлення пухлин у молочних залозах. Жінки, які не мають менструації, повинні проводити самообстеження у той же день кожного місяця, який вони визначили самостійно. Процедура складається з огляду та самопальпації молочних залоз та пахвових лімфовузлів, і рекомендується проводити її у вертикальному та горизонтальному положенні тіла. Під час огляду слід звернути увагу на зміни кольору, форми та виразкування сосків і шкіри молочних залоз. При проведенні пальпації необхідно дотримуватися методичного підходу, спочатку проводячи поверхневу, а потім глибоку пальпацію. Обов'язково необхідно пропальпувати всі ділянки молочних залоз, звертаючи особливу увагу на пахові та шийно-надключичні лімфовузли. У разі виявлення будь-яких змін необхідно якомога швидше звернутися до лікаря.

За останні роки, завдяки комплексному підходу, лікування раку молочної залози значно поліпшилося. Сучасний етап в лікуванні РМЗ характеризується відмовою від довготривалої агресивної хірургічної тактики та широким використанням органозберігаючого лікування (ОЗЛ). Це можна пояснити кількома причинами, в тому числі своєчасним виявленням захворювання на початкових стадіях РМЗ, що призвело до поліпшення виживання, а також підвищенням вимог пацієнтів і лікарів до естетичних результатів лікування РМЗ. У цьому процесі важливу роль також відіграла ефективна комбінація оперативного втручання з променевою та хіміогормональною терапією.

1. Імуногістохімічний метод дослідження раку молочної залози - це метод, що дозволяє виявити певні білки в клітинах пухлинної тканини молочної залози за допомогою антитіл, які реагують з

цими білками. Цей метод зазвичай використовується для підтвердження діагнозу РМЗ [18], визначення його стадії та вибору оптимального лікування. Імуногістохімічний метод (ІГХ) полягає у застосуванні спеціальних антитіл, які розпізнають певні білки в клітинах ракової тканини молочної залози.

Якщо в клітинах зразка експресуються дослідні білки, то антитіла будуть зв'язуватися з ними та утворювати комплекси антиген-антитіло. Ці комплекси можна візуалізувати за допомогою спеціальних методів, таких як імунопероксидазний метод або імунофлюоресцентний метод. Результати дослідження можуть бути оцінені під мікроскопом.

Для дослідження раку молочної залози застосовують ІГХ для виявлення певних білків, що є маркерами ракових клітин [19]. Одним з найбільш використовуваних маркерів є рецептор естрогенів (ER) – це біомаркер, який використовується для виявлення наявності рецепторів естрогенів на поверхні клітин. Цей рецептор взаємодіє з естрогенами, жіночими стероїдними гормонами, що виробляються в яєчниках та в молочних залозах. Для виявлення ER використовують імуногістохімічний аналіз, який використовує антитіла, спрямовані проти рецепторів естрогенів, для визначення їх наявності на поверхні клітин.

Результати тесту можуть бути відображені як ER-позитивні або ER-негативні, залежно від наявності або відсутності експресії [20]. У разі виявлення ER-позитивного раку молочної залози, це означає, що клітини мають рецептори естрогенів, які можуть сприяти росту та розвитку хвороби.

Рецептор прогестерону (PR) – це рецептор, що взаємодіє з прогестероном, іншим жіночим стероїдним гормоном, що секретуються в яєчниках та в молочних залозах. Клітини, які експресують PR, також можуть рости та ділитись за наявності прогестерону [21].

Епідермальний фактор росту людини 2 (human epidermal growth factor receptor-2, або HER2/neu) – рецептор епідермального фактору росту, який стимулює поділ клітин. Тобто збільшення кількості таких рецепторів змушує

клітини рости і ділитися швидше. Нормальні клітини молочної залози мають дві копії гена HER2. При РМЗ в геномі пухлинних клітин можуть утворюватися численні копії цього гена (ампліфікація гена) [20], це призводить до зростання кількості HER2 на мембрані клітини та посилення сигналізації, що стимулює поділ. HER2/neu може бути експресований у різних типах раку, але особливо часто він є зміненим і відповідає за розвиток так званого HER2-позитивного раку молочної залози. Цей тип новоутворень відзначається тим, що пухлинні клітини виробляють надмірну кількість HER2/neu, що призводить до швидшого росту, поділу клітин і поширення пухлини.

Визначення експресії HER2/neu є важливим молекулярним маркером для вибору оптимальної стратегії лікування пацієнтів з раком молочної залози. Пацієнти з HER2-позитивним РМЗ можуть бути кандидатами для лікування таргетованими терапіями, які спрямовані на блокування дії HER2/neu і призначені для зниження ризику рецидиву та покращення перспектив на виживання. При позитивному HER-2/neu-статусі 5-річна виживаність становить 56%, при негативному - 73% [23]. Також експресія HER2/neu свідчить про резистентність пухлини до хіміотерапії, в тому числі до тамоксифену. Рецептори знаходяться на клітинній мембрані, тому клітинним елементом, зафарбованим в ІГХ реакції, є саме мембрана клітини.

Ki-67 – маркер активної проліферації, клінічний показник, який показує, агресивність поділу клітин пухлини. Ki-67 дозволяє виділити пухлинні клітини, які знаходяться в активній фазі клітинного циклу по всій його довжині, крім G0-періоду [24]. Даний медичний маркер визначає швидкість росту новоутворення, здатність його до метастазування, відповідь на лікувальні заходи і результат онкологічного захворювання. Чим вище відсоток проліферативної активності, тим з більшою ймовірністю пухлина відповідь на хіміотерапевтичне лікування в результаті. При низькому рівні даного показника пухлина в більшій мірі відреагує на гормонотерапію.

Показники процентної активності в результаті тесту для кожної пухлини індивідуальні і визначаються локалізацією патологічного процесу.

Додаткове імуногістохімічне дослідження маркеру Ki-67 призначають для діагностики раку будь-якої локалізації, доброякісних утворень з метою виключення виникнення злоякісної пухлини. Точність захворювання підтверджує додаткове обстеження та консультація з лікарем-онкологом. Дослідження проводиться при підозрі на наявність пухлинного росту в організмі, при пухлинах молочної залози для оцінки можливості лікування гормонами, для уточнення прогнозу й вибору методу лікування.

Результат видається у вигляді опису мікропрепарату з біологічним матеріалом, застосовуваних барвників і ув'язнення. У висновку зазначається індекс білка Ki-67 в разі позитивної реакції. Цей показник виражається у відсотках. У разі визначення Ki-67 менше 15% – новоутворення має низьку агресивність, якщо рівень експресії Ki-67 коливається в діапазоні 30-50% – пухлина агресивна, якщо вище 50% – високоагресивна [25].

Від молекулярно-генетичних особливостей пухлини залежить прогноз перебігу захворювання та особливості лікування. Враховується наявність або відсутність у пухлинних клітин ER, PR та HER2/neu, а також інших молекулярних та генетичних маркерів.

Виділяють наступні підтипи РМЗ:

Люмінальний А. Це пухлини з позитивними ER та/або PR, негативним HER2, з низьким рівнем білка Ki67. Пухлини є високодиференційованими (G1), як правило, повільно ростуть, хвороба має найкращий прогноз.

Люмінальний В. Позитивні ER та/або PR, HER2-позитивні або HER2-негативні з високим рівнем Ki67. Пухлини ростуть швидше, ніж рак люмінального підтипу А, їх прогноз дещо гірший.

Тричі негативний рак молочної залози. Має негативні показники експресії трьох рецепторів. Цей тип раку частіше зустрічається у жінок із мутаціями генів BRCA1 та серед молодих жінок.

HER2-позитивний. Пухлини негативні до ER та PR та позитивні HER2. Пухлини ростуть швидше за люмінальні підтипи, можуть мати найгірший прогноз, проте добре лікуються за допомогою таргетної терапії, спрямованої на білок HER2 [26].

Для того щоб кожна жінка мала можливість повністю одужати від раку молочної залози, важливо виявляти захворювання на ранніх стадіях та забезпечувати якісне лікування з широким вибором схем. Тому надзвичайно важливо виявляти рак молочної залози як можна раніше.

Лікування раку молочної залози залежить від кількох факторів, таких як розмір та місцезнаходження пухлини, результати лабораторних аналізів ракових клітин, стадія або поширеність захворювання, його патогенетична форма та наявність супутніх захворювань. Для визначення ступеня поширення раку пацієнтці можуть бути призначені додаткові аналізи.

Сьогодні вже відомо, чи впливають в значній мірі особливості характеристик клітин пухлини на прогноз та віддалену виживаність пацієнта. З іншого боку, детальний аналіз фенотипу пухлини дозволяє максимально індивідуалізувати лікувальну тактику.

Фундаментальні дослідження останніх десятиліть чітко доводять, що найбільш ефективним є поєднання кількох методів лікування. Цей факт неминуче впливає на застосування ідеології хірургічних підходів у лікуванні раку молочної залози.

У 1891-1894 рр. W. Halsted і W. Meyer опублікували результати своєї хірургічної методики, яка включала видалення молочної залози, грудних м'язів та лімфатичних вузлів трьох рівнів. Цей метод став відомим як класична операція Холстеда-Мейера та був широко застосовуваний протягом більше 100 років в хірургічному лікуванні РМЗ на різних стадіях [27].

У 1898 році D. Patey та W. Dyson винайшли свій метод радикальної операції, який полягав у збереженні великого грудного м'яза разом із перетином та видаленням малого грудного м'яза у єдиному блоку. Під час аналізу віддалених результатів було встановлено, що вони ідентичні та

порівнянні з операцією Холстеда. Ця модифікація має такі переваги, як краще загоєння рани, малу кількість післяопераційних ускладнень та кращі косметичні та функціональні результати [28].

Наступним етапом у розвитку модифікованих операцій стало видалення лімфовузлів I-II рівня разом з молочною залозою в єдиному блоку зі збереженням обох грудних м'язів, що було запропоновано J. Madden в 1965 році. Саме цей тип хірургічного втручання став прототипом сучасної операції зі збереженням обох грудних м'язів. З початку 90-х років модифікований варіант радикальної мастектомії зі збереженням великого і малого грудних м'язів є стандартом оперативних посібників на всіх стадіях раку молочної залози [29].

Іншою значущою подією в історії хірургічного лікування раку молочної залози є виникнення органозберігаючої операції у 70-80-х роках минулого століття. Спочатку ця операція була проведена в обсязі квадрантектомії з лімфодисекцією лімфовузлів I-III рівнів та наступною променевою терапією. Цей метод був привабливий тим, що дозволяв зберегти частину молочної залози без шкоди й радикалізму та забезпечував набагато вищий косметичний ефект. Однак, обов'язковою складовою цієї терапевтичної тактики було променеве опромінення залишкової частини органу з метою контролю локального рецидивування.

Важко обмежити вплив лікування РМЗ так, щоб видалити або знищити тільки злоякіснотрансформовані клітини, оскільки під час лікування можуть бути пошкоджені нормальні клітини та тканини, що часто призводить до неприємних побічних ефектів для жінки.

При видаленні молочної залози, особливо якщо вона є великою, центр маси тіла зміщується, що може призвести до дискомфорту в області шиї та спини. Крім того, шкіра в цій області може бути натягнута, а м'язи рук і плечей - напружені. Навіть якщо м'язова слабкість та обмеження рухів зазвичай тимчасові, деякі жінки можуть втратити силу в м'язах назавжди. Також під час операції можуть бути пошкоджені нервові закінчення, що

може призвести до відчуття оніміння та легкого свербіжу в молочній залозі, плечі, пахвовій западині або руці.

Променева терапія може бути використана при наданні допомоги онкологічним хворим відповідно до стратегічних завдань наступним чином: як самостійний метод лікування; в поєднанні з хірургічним втручанням; або в комбінації з хіміо- та гормонотерапією [30].

Для знищення та зупинки росту трансформованих клітин під час променевої терапії використовуються високі дози енергії.

Променева терапія може бути використана як основний або самостійний метод лікування онкологічних хворих у різних випадках:

- Вона може бути вибрана як більш естетичний або функціональний метод з однаковою ефективністю порівняно з іншими методами лікування;

- Крім того, вона може бути єдиним можливим методом для неоперабельних хворих на злоякісні новоутворення або для пацієнтів, які відмовляються від оперативного лікування.

Процедура зовнішнього опромінення проводиться кожен день, або пацієнти госпіталізуються для повного курсу лікування. Якщо променева терапія слідує за операційним втручанням, лікування зазвичай проводиться 5 днів на тиждень протягом п'яти-шести тижнів, після чого на ділянку пухлини надається підвищена доза радіації. Існують також інші варіанти променевої терапії, які обираються індивідуально.

Побічні ефекти даного методу лікування включають червоніння та збільшену чутливість шкіри на місці опромінення, а також можливу сухість. Вплив радіаційної терапії на шкіру є тимчасовим і шкірний покрив повністю відновлюється після закінчення лікування. Опромінення може призвести до затвердіння молочної залози, а також змін у її розмірі, який може збільшитися за рахунок накопичення рідини або зменшитися через зміни в тканинах.

Гормонотерапія використовується в медичній практиці з метою запобігання злоякісним клітинам отримання потрібних гормонів для їх росту

та поширення, або, навпаки, надання гормонів, які пригнічують їх ріст. Цей вид лікування включає в себе застосування препаратів, що впливають на гормональний баланс організму, а також може включати хірургічне видалення яєчників, які виробляють гормони, цю процедуру називають оваріектомією. Гормонотерапія також є системним лікуванням, оскільки вона впливає на ракові клітини в організмі в цілому.

У 1962 році Е. Jensen і Н. Jacobson створили радіоактивний естрадіол, що дозволило переконатися в наявності рецепторів естрогену в тканинах-мішенях та подальшому використанні цього відкриття для визначення рівня рецепторів та прогнозування гормоночутливості. Це відкриття відіграло важливу роль у розвитку гормонотерапії, зокрема РМЗ, у наступні десятиліття [30].

На сьогодні гормонотерапія є ключовою складовою комплексного чи комбінованого лікування усіх стадій раку молочної залози. Висока ефективність гормонотерапії вказує на те, що пухлини цього типу є гормонозалежними. Проте, лікувальний ефект вдалося отримати тільки у 32-40% хворих, застосовуючи цей метод [31]. Крім того, серед різних видів гормонотерапії немає однозначного лідера, що має найбільшу частоту об'єктивного лікувального ефекту.

Гормональна терапія може викликати побічні ефекти, які залежать від типу та дози препарату, а також відрізняються для кожної людини. Один з найбільш поширених препаратів для гормональної терапії - тамоксифен - блокує використання естрогену в організмі, але не зупиняє його вироблення. Цей препарат може спричиняти припливи, виділення з піхви, подразнення, нерегулярність менструального циклу, проте він не призводить до менопаузи або безпліддя.

1.3. Репродуктивний статус та РМЗ

РМЗ у жінок може впливати на їх репродуктивний статус, особливо якщо вони проходять лікування.

Лікування РМЗ може включати хірургічне видалення ураженої ділянки молочної залози, радіотерапію та хіміотерапію. Ці методи можуть мати вплив на функцію яєчників та гормональний фон жінки, що може призвести до порушень репродуктивної функції [32, 33].

Залежно від типу та стадії РМЗ, лікар може порекомендувати збереження фертильності перед початком лікування. Це може включати заморожування яйцеклітин або зародків, використання інгібіторів гонадотропіну або інші методи [34].

Таким чином, РМЗ може впливати на репродуктивний статус жінок, і тому важливо обговорити ці питання зі своїм лікарем перед початком лікування.

Крім того, РМЗ може впливати на емоційний стан жінки та її партнера, що може відбитись на статевих відносинах та бажанні мати дітей. Для підтримки психологічного стану жінок, які пройшли лікування раку молочної залози, можуть запропонувати консультування психолога, групову підтримку та інші форми допомоги.

Жінки, які пережили РМЗ, мають підвищений ризик розвитку рецидиву раку та потребують регулярного моніторингу та контролю. Вони також можуть потребувати спеціалізованої медичної допомоги при виникненні проблем, пов'язаних зі здоров'ям молочної залози або репродуктивної системи.

Жінки, які мають діагноз новоутворення цієї локалізації та хочуть мати дітей після лікування, повинні обговорити ці питання зі своїм лікарем. Лікар має розглянути індивідуальну ситуацію кожної жінки та ризики, пов'язані зі збереженням фертильності. Також, лікар має враховувати, що лікування РМЗ

може вплинути на ефективність різних методів збереження фертильності [35].

Один з таких методів - замороження яйцеклітин. Цей процес включає стимуляцію яєчників з метою отримання більшої кількості яйцеклітин, які потім заморожуються для майбутнього використання. Цей метод дозволяє жінкам зберегти свою фертильність та мати можливість мати дітей у майбутньому.

Інший метод збереження фертильності - замороження тканин яєчників. Цей процес включає хірургічне видалення тканини яєчників та її замороження для майбутнього використання [36]. Цей метод дозволяє зберегти гормональну функцію яєчників та можливість мати дітей у майбутньому.

Інші методи збереження фертильності, такі як замороження ембріонів та корпускулярного рідини, також можуть бути рекомендовані залежно від індивідуальних потреб кожної жінки та характеру її раку молочної залози.

Важливо зазначити, що у деяких випадках лікування РМЗ може призвести до передчасної менопаузи, коли жіночий організм перестає виробляти яйцеклітини. Це може призвести до втрати можливості мати дітей без використання методів збереження фертильності.

Крім того, жінкам з РМЗ рекомендується проводити регулярний моніторинг свого репродуктивного здоров'я та взаємодіяти зі своїм лікарем, щоб зрозуміти свої індивідуальні ризики та можливості. Також можна розглядати питання профілактики цього захворювання, такі як регулярне обстеження та вживання здорового способу життя, щоб зменшити ризики повторення захворювання.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 2.1

2.1. Клініко патологічні характеристики пацієнтів

	Кількість	%
Число пацієнтів	40	100
Середній вік пацієнток	49,05±5,9	
Флуктуації значень віку	28-82	
Розмір новоутворення T		
T1	22	55
T2	18	45
Статус ураження регіонарних лімфовузлів N		
N0	24	60
N1	16	40
Ступінь диференціювання G		
G1	8	20
G2	21	52,5
G3	11	27,5
Молекулярний підтип		
Люмінальний	24	60
HER2 позитивний та Базальний	16	40
Менопаузальний статус		
Відсутня	9	22,5
Менопауза впродовж 1-15 років	17	42,5
Менопауза впродовж 15-35 років	14	35
Кількість абортів		
0	18	45
1-4	15	37,5
5 та більше	7	17,5
Пологи		
0	7	17,5
1	14	35
2	11	27,5
3 та більше	8	20

В дослідженні використовували матеріал 40 хворих на РМЗ I-II стадії, що знаходились на лікуванні в у Київському міському клінічному

Отформатировано: По ширине, Отступ: Первая строка: 1 см

онкологічному центрі протягом 2013-2015 років і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях, загальна клінічна характеристика яких хворих представлена у табл.2.1.

2.2. Морфологічне дослідження операційного матеріалу

Операційний матеріал фіксували впродовж однієї доби при кімнатній температурі в 10% розчині забуференого нейтрального формаліну (40% формалін – 100 мл, однозаміщений фосфат натрію (моногідрат) – 4 г, двохзаміщений фосфат натрію (безводний) – 6,5 г). Потім промивали його у проточній воді протягом 1 години. Надалі матеріал поступово зневоднювали у розчинах етилового спирту висхідної концентрації (50°, 70°, 80°,) та у 2 порціях 96° етанолу (використовували замість абсолютного спирту) і піддавали целоїдин-парафіновій гістологічній проводці з наступною заливкою в парафінові блоки з додаванням 5% натурального воску.

За допомогою роторного мікротома виготовляли зрізи товщиною 5-7 мкм, які розміщували на хімічно чистих предметних скельцях. Перед фарбуванням тканин проводили депарафінізацію зрізів, витримуючи їх протягом 20 хв у 2 порціях ксилолу, потім стільки ж часу у 96 % етиловому спирті. Фарбування проводили, наносячи на зрізи гематоксилін 7211 (Thermo Scientific, USA). Через 5 хв надлишок гематоксиліну видаляли, а скельця зі зрізами залишали у проточній воді до набуття тканиною характерного темно-синього забарвлення. Зрізи тканини дофарбовували в спиртовому розчині еозину-Y (Thermo Scientific, USA) протягом 1с з подальшою інкубацією скелець в розчині етанол-еозин (1:1) та етиловому спирті по 10 хв, відповідно. Після цього скельця витримували у ксилолі до посвітління тканинних зразків.

2.3. Визначення молекулярних підтипів РМЗ за допомогою імуногістохімічного методу

Для оцінки молекулярного підтипу РМЗ використовували гістологічні зрізи (товщина 5-7 мкм) парафінових блоків операційного матеріалу. На них проводили імуногістохімічне-ІГХ дослідження експресії ER, PRрецепторів естрогену та прогестерону, Ki-67, а також енідермального фактору росту тину 2HER2/neu.

Першим етапом імуногістохімічної-ІГХ реакції була депарафінізація гістологічних зрізів шляхом занурення скельць з гістологічними зрізами спочатку в орто-ксілол на 20 хв, потім в 96% етанол на 20 хв та подальшого промивання у двох порціях дистильованої води по 3 хв. Для демаскування антигенів скельця зі зрізами поміщали у цитратний буфер (pH 6,0) на водяну баню (Biosan WB-4MS, Latvia) на 20 хв. Щоб виготовити цитратний буфер, змішували 10,0 мл 0,1М розчину лимонної кислоти з 40,0 мл 0,1М розчину цитрату натрію і доводили до об'єму 500,0 мл дистильованою водою.

Імуногістохімічне дослідження експресії досліджуваних маркерів проводилося із застосуванням Ultra Vision LP Detection System фірми Thermo Scientific (USA) (табл.2.2.).

Таблиця 2.2

Склад реагентів системи детекції

№	Назва реагенту	Об'єм
1	UltraVision Hydrogen Peroxide Block	15 мл
2	UltraVision Protein Block	15 мл
3	Primary Antibody Enhancer	15 мл
4	HRP Polymer	15 мл
5	DAB Quanto Substrate	15 мл
6	DAB Quanto Chromogen	1 мл

Етапи імуногістохімічної-ІГХ реакції:

Отформатировано: украинский, не выделение цветом

Отформатировано: украинский, не выделение цветом

1) Охолоджували препарати при кімнатній температурі до +25°C, промивали їх у трьох порціях дистильованої води по 2 хв.

2) Проводили блокування ендогенної пероксидази з використанням Hydrogen Peroxidase Block протягом 10 хв при кімнатній температурі, двічі промивали у різних порціях дистильованої води по 2 хв і тричі у різних порціях фосфатного буферу (PBS) (pH 7,4) по 5 хв.

3) Надлишок буферу обережно, не торкаючись зрізу і не допускаючи висихання останнього, забирали з двох боків клаптиками фільтрувального паперу і розташовували у вологій камері, де виконували всі наступні процедури.

4) Блокування неспецифічних білків (для запобігання неспецифічного забарвлення) здійснювали шляхом інкубації зрізів у присутності Protein Block протягом 5 хв при кімнатній температурі.

5) У пухлинній тканині досліджували експресію молекулярних маркерів шляхом застосування відповідних моноклональних антитіл (табл. 1.2, 2.2, 3.). Інкубацію з даними антитілами в оптимальному розведенні проводили впродовж 1 год. Після цього скельця зі зрізами промивали у трьох порціях PBS (pH 7,4) для видалення залишків реагенту.

Таблиця 2.3.

Молекулярні маркери та моноклональні антитіла, які були використані для проведення ІГХ досліджень

Молекулярний маркер	Клон	Розведення	Фірма - виробник
Ki-67	SP6	1:250	ThermoScientific, USA
ER α	1D5	1:50	DakoCytomation, Denmark
ER β	14C8	1:50	Thermo Scientific, USA
PR	PgR636	1:50	DakoCytomation,

			Denmark
HER2/neu	e2-4001	1:50	Thermo Scientific, USA

6) Для візуалізації білка далі використовували Primary Antibody Enhancer (кон'юговані вторинні антитіла antiMouse з полімерним ланцюгом декстринової молекули), що наносили і залишали на зрізах при кімнатній температурі на 10 хв, після чого промивали в PBS (pH 7,4).

7) Забарвлення білка здійснювали за допомогою хромогену для пероксидази хрому (HRP Polymer) – 3,3'-діамінобензидину тетрахлориду (DAB), продукт реакції якого має коричневий колір.

8) Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном Майєра (Thermo Scientific, При проведенні імуногістохімічних досліджень кожного разу ставили контрольні реакції для перевірки специфічності взаємодії антитіл і, таким чином, отримання достовірних результатів. У якості позитивного контролю використовували препарати зі зрізами тканин, у яких було виявлено гіперекспресію маркеру. Негативним контролем були зрізи пухлин молочної залози, на які не наносили моноклональні антитіла.

Аналіз результатів проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричнєве забарвлення цитоплазми та/або ядер) за допомогою світлового мікроскопу PrimoStar (Zeiss, Німеччина) на збільшеннях x100-400.

Визначали кількість клітин з позитивною експресією маркерів, враховуючи ступінь прояву імуногістохімічної реакції: «+++» - сильний, «++» - помірний, «+» - низький або відсутність експресії (0). На основі рівня експресії досліджуваних маркерів і визначали молекулярні підтип: люмінальний А (ER+, PR+, Her2/neu-), люмінальний Б (ER+, PR +, Her2/neu+); Her2/neu-позитивний (ER-, PR-, Her2/neu+) та базальний (або тричі негативний підтип) (ER -, PR -, Her2/neu-).

2.4. Біоінформатичні методи досліджень

Порівняння рівнів експресії досліджуваних генів у пухлинній тканині хворих на РМЗ по відношенню до показників у немалігнізованих клітинах молочної залози проведено за допомогою ресурсу The University of ALabama at Birmingham CANcer data analysis Portal - UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>).

Код поля изменен

UALCAN – онлайн що містить інформацію про рівні експресії генів, мікроРНК, довгих некодуючих РНК, метилювання промоторної ДНК від TCGA та ін. у пухлинній тканині при 33 типах раку.

2.5. Статистичні методи досліджень

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми GraphPad Prism v.8.0 (GraphPad Software Inc., USA) з урахуванням характеру розподілу отриманих даних. Порівняння достовірності відмінностей середніх величин проводили з використанням t-критерію Стьюдента (при параметричному розподілі) або U-критерію Манн – Уїтні (за непараметричного розподілу).

Дані представлені у вигляді $M \pm m$, де M – середнє арифметичне, m – стандартна помилка середнього або у вигляді процентного співвідношення для відносних величин. Критичний рівень статистичної значимості приймали рівним 0,05.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На початку нашого дослідження було проведено гістологічне зафарбування зразків тканини РМЗ класичною методикою гематоксиліном та еозином (рис.3.1.).

Морфологічне дослідження операційного матеріалу показало, що частіше діагностувався інфільтративний протоковий РМЗ – 65,0 % випадків, ніж інфільтративний дольковий РМЗ – 35,0 %. Встановлено, що у більшості хворих (62,0%) визначено помірний ступінь диференціювання пухлин, низький ступінь диференціювання РМЗ у 28,0%, у найменшій кількості хворих (10,0%) діагностовано високий ступінь диференціювання новоутворень. Мікроскопічний аналіз пухлин молочної залози виявив значний поліморфізм гістологічної структури та клітинної атипії обох морфологічних форм РМЗ. Звертала на себе увагу різноманітність типу росту пухлинних клітин: солідний, криброзний, скірозний.

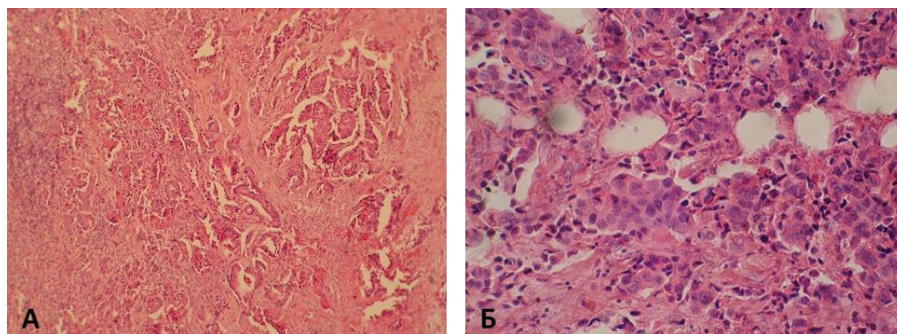


Рис.3.1. Мікрофотографія. Гістологічне забарвлення тканини новоутворень молочної залози (забарвлення гематоксиліном та еозином (А – 36. 100х, Б – 36. 400х)

Наступним етапом стало проведення ІГХ аналізу задля визначення молекулярного підтипу новоутворень (рис 3.2.). За імуногістохімічною характеристикою досліджені пухлини хворих поділялись на 2 групи підтипів: люмінальний А та Б – 55,0%, а також HER2/неу базальний (або тричі негативний підтип) – 45,0%.

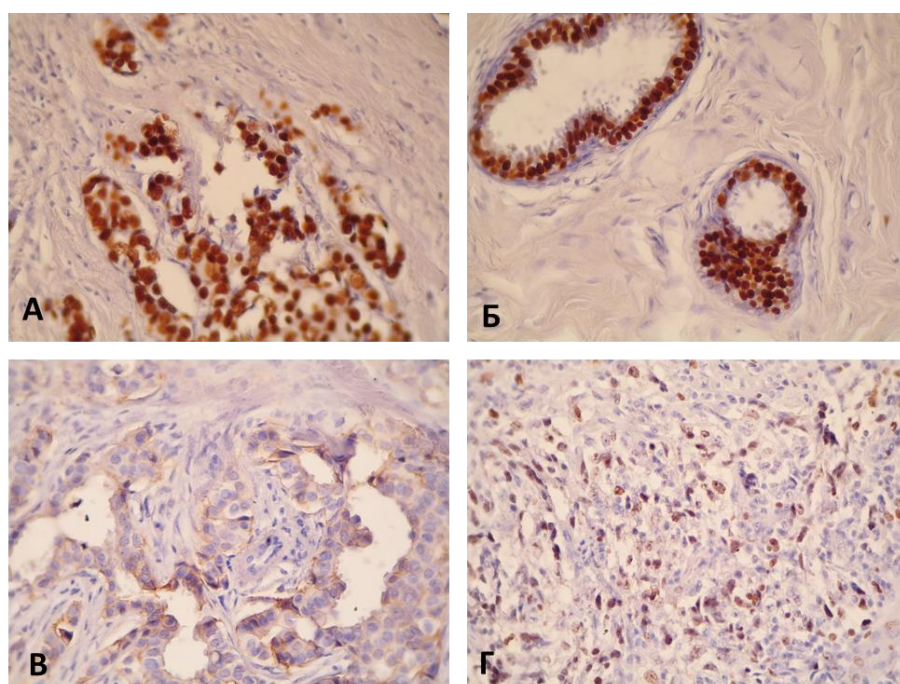


Рис.3.2. Мікрофотографія. Імуноцитохімічне забарвлення тканини новоутворень молочної залози для визначення рівнів експресії: А – ER, Б – PR, В – HER2/неу, Г – Ki-67 (36. 400x)

Далі було проведено біоінформатичне порівняння експресії Ki-67 на рівні мРНК у зразках нормальної та злоякісно трансформованої тканини молочної залози. Продемонстровано статистично достовірно вищий в 11

разів ($*p<0.05$) рівень експресії цього фактору саме в тканині РМЗ. В нормальній тканині він складав 1.143 TPM, а в тканині РМЗ – 11,083 TPM. Це говорить про зростання експресії гену *MKI67* в ході процесів малігнізації та розвитку РМЗ (рис.3.3).

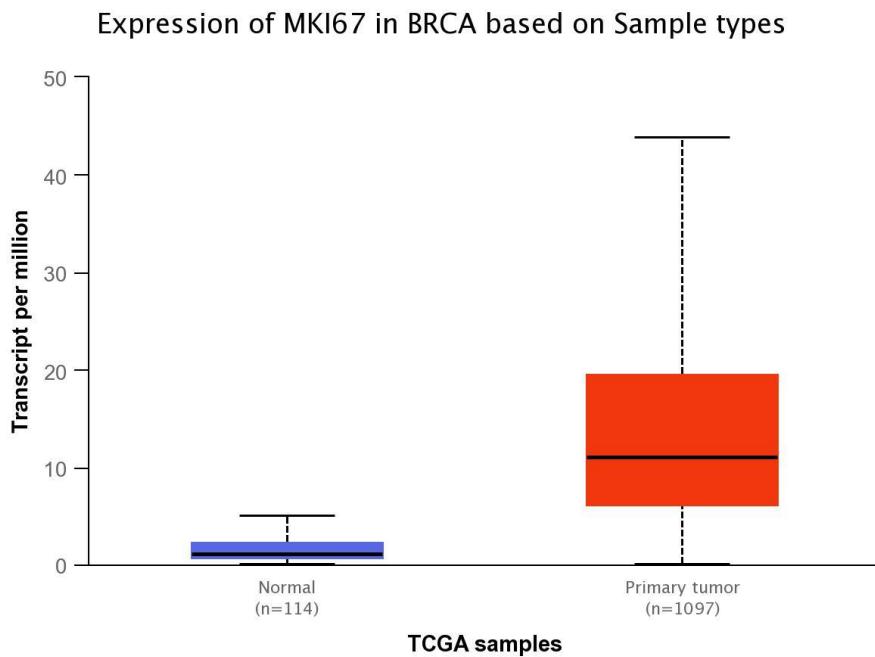


Рис.3.3. Біоінформатичний аналіз експресії Ki-67 в зразках нормальної та злоякісно трансформованої тканини молочної залози із використанням бази даних UALCAN ($p<0.0005$)

На наступному етапі роботи нами було проведено дослідження ступеня проліферативної активності новоутворень залежно від рецепторного статусу клітин та молекулярного підтипу новоутворень (рис.3.4.). Доведено, що у зразках із відсутністю експресії ER та PR рівень експресії Ki-67 за результатами цитохімічного дослідження був достовірно вищим ($*p<0.05$). В випадку HER2/неу ситуація була протилежною. Достовірно вищі ($*p<0.05$)

значення експресії Ki-67 фіксувалися саме в HER2/neu позитивних новоутвореннях. Крім того показано статистично значуще збільшення (* $p<0.05$) експресії гену *MKI67* в новоутвореннях базального та HER2/neu позитивного молекулярного підтипу, порівняно із групою зразків із люміналіними А та Б підтипами.

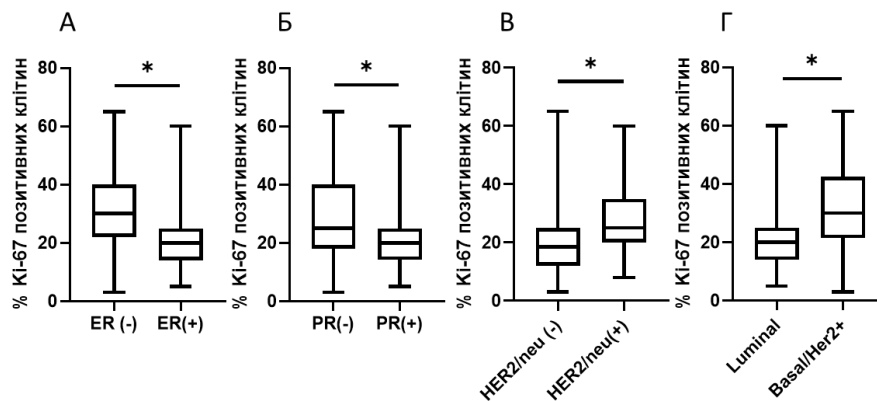


Рис.3.4. Аналіз проліферативної активності новоутворень молочної залози залежно від рецепторного статусу та молекулярного типу пухлин. А – залежно від експресії ER, Б – з залежно від експресії PR, В – залежно від експресії HER2/neu, Г – залежно від молекулярного підтипу (* $p<0.05$)

На наступному етапі за допомогою бази даних UALCAN було проведено біоінформатичне дослідження зв'язку експресії Ki-67 із зразками нормальної тканини молочної залози та РМЗ різних молекулярних підтипів. Як видно на рис. 3.5., спостерігається чітка динаміка зростання експресії гену *MKI67* в ході зростанні ступеня злоякісності на агресивності новоутворення. Значення експресії Ki-67 на рівні мРНК між усіма групами відрізнялися достовірно ($p<0.05$).

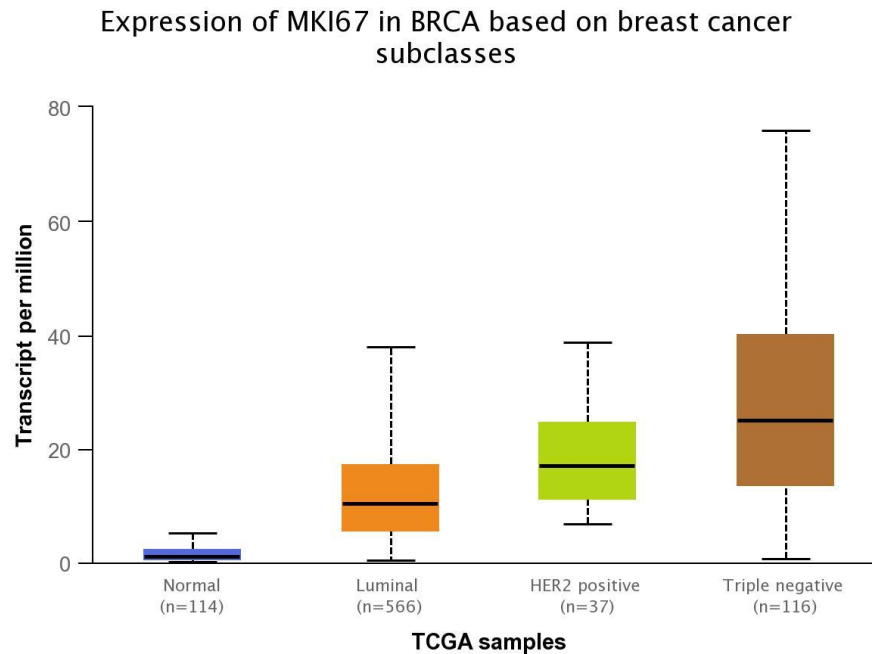


Рис.3.5. Біоінформатичний аналіз експресії Ki-67 в зразках нормальної та злоякісно трансформованої тканини молочної залози, залежно від молекулярного підтипу новоутворення, із використанням бази даних UALCAN.

Нами також було проведено порівняння значень проліферативної активності новоутворень залежно від розміру пухлин (T), метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (N), а також від ступеня диференціювання новоутворень (рис.3.6.). Показано, що в ході зменшення ступеня диференціювання новоутворень (G) спостерігається достовірне зростання експресії Ki-67 ($p < 0.05$). Різниці в групах новоутворень, розділених за їх розмірами та статусом ураження лімфатичних вузлів, достовірної різниці в показниках експресії Ki-67 на рівні білка після проведення ІГХ аналізу не було.

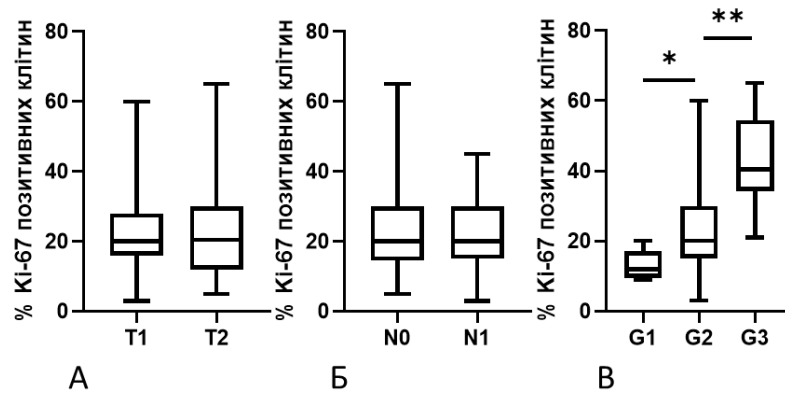


Рис.3.6. Дослідження проліферативної активності новоутворень молочної залози залежно від TNM класифікації та ступеня диференціювання пухлини. А – залежно від розміру пухлини (Т стадія), Б – залежно від статусу ураження лімфатичних вузлів (N стадія), В – залежно від ступеня диференціювання G (* $p < 0.05$)

Порівнюючи значення, отримані із бази даних UALCAN, показано, що в ході зростання ступеня ураження регіонарних лімфатичних вузлів в ході РМЗ достовірних змін експресії білка Ki-67 не спостерігалось (рис3.7.).

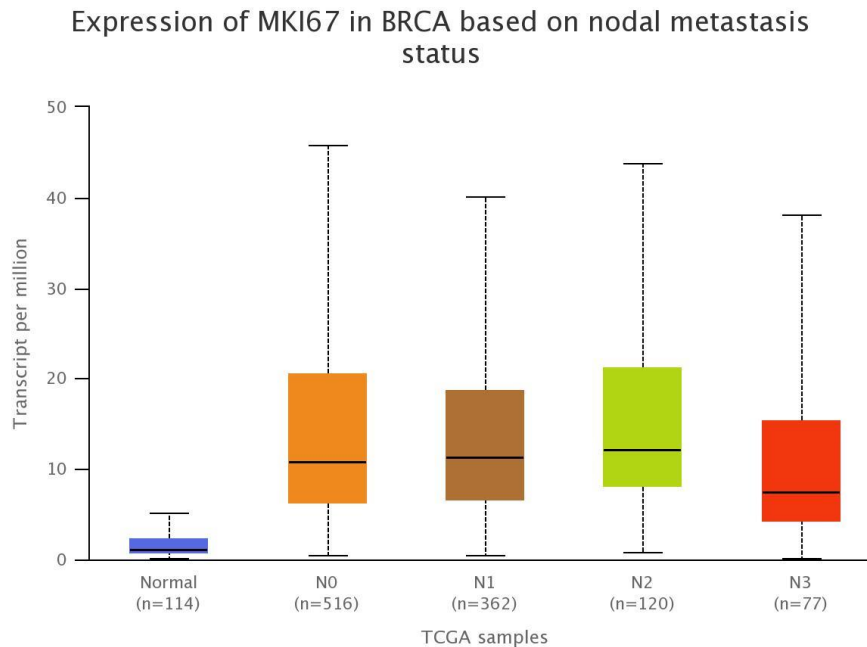


Рис.3.7. Біоінформатичний аналіз експресії Ki-67 в зразках нормальної та злоякісно трансформованої тканини молочної залози, залежно від статусу метастатичного ураження лімфатичних вузлів, із використанням бази даних UALCAN

В ході аналізу рівня проліферативної активності в залежності репродуктивного статусу було розглянуто показники віку, менопаузального статусу, кількості пологів та абортів у хворих на РМЗ. Доведено, що пацієнтки молодого віку до 45 років характеризувалися достовірно вищими (* $p < 0.05$) значеннями експресії Ki-67 порівняно із жінками із ~~діагностованим~~ РМЗ та старшими за 45 років. Також було виявлено, що новоутворення молочної залози жінок, які за життя мали 3 та більше пологів порівняно із жінками, що мали 1-2 пологів характеризувалися статистично значущо меншими (* $p < 0.05$) показниками експресії гену *MKI67* на рівні білка

(рис.3.8.). Достовірної різниці в рівнях експресії Ki-67 залежно від кількості абортів пацієнток або менопаузального статусу виявлено не було.

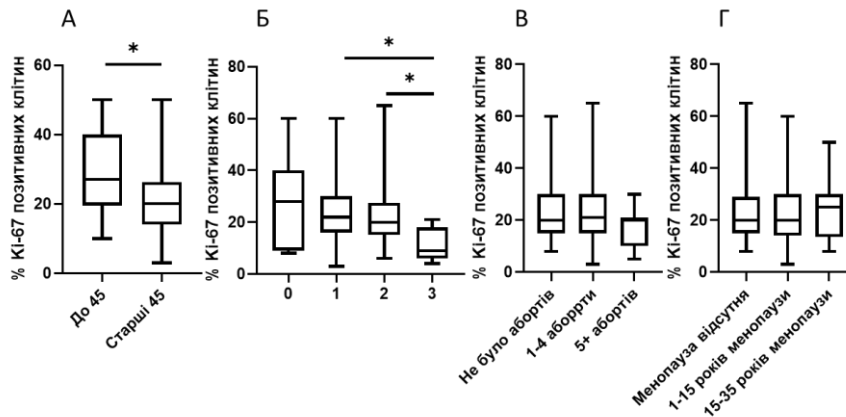


Рис.3.8. Дослідження проліферативної активності новоутворень молочної залози залежно від репродуктивного статусу пацієнток. А – залежно від віку, Б – з залежно від кількості пологів, В – залежно від кількості абортів, Г – залежно від статусу менопаузи (* $p < 0.05$)

Після біоінформатичного аналізу зв'язку проліферативної активності новоутворень РМЗ без менопаузи, а також на різних її стадіях достовірної різниці між експресією Ki-67 на різних стадіях менопаузи не виявлено (рис.3.9.). Проте доведено, що новоутворення пацієнток, які не мають менопаузи характеризувалися меншими показниками проліферативної активності (* $p < 0.05$).

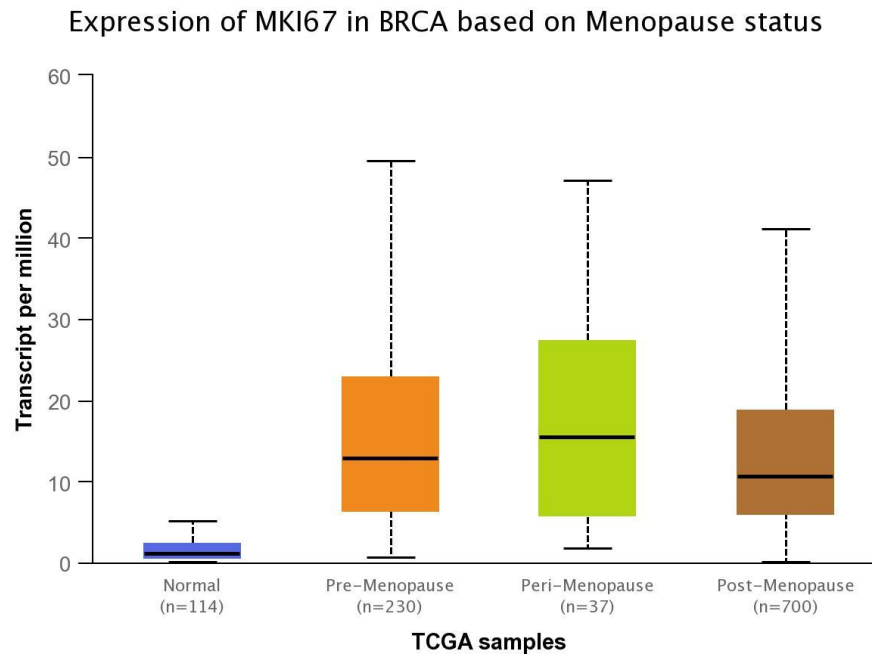


Рис.3.9. Біоінформатичний аналіз експресії Ki-67 в зразках нормальної та злоякісно трансформованої тканини молочної залози, залежно від менопаузального статусу, із використанням бази даних UALCAN

На наступному етапі було проведено біоінформатичне дослідження показників виживаності пацієток із РМЗ залежно від рівнів експресії гену *MKI67*. Показано, що в жінок із високими рівнями експресії Ki-67 значення 10-ти річної загальної виживаності були на 25 відсотків гіршими (* $p < 0.05$) ніж у пацієток низьким рівнем експресії цього білка. Рівниця була статистично значущою (рис.3.10.).

Також слід зазначити що показники безрецидивної виживаності в жінок із високим рівнем експресії гену *MKI67* були на 19 відсотків достовірно меншими, аніж аналогічні значення в жінок із низькою експресією Ki-67 (рис.3.11.).

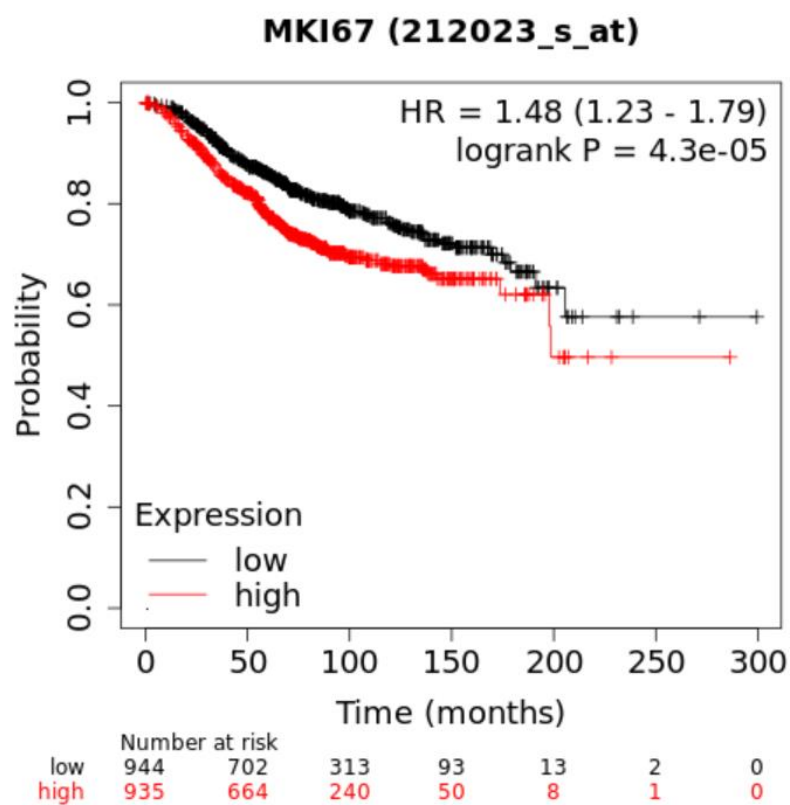


Рис.3.10. Біоінформатичний аналіз показників загальної виживаності залежно від рівня експресії Ki-67, із використанням бази даних KM Plotter

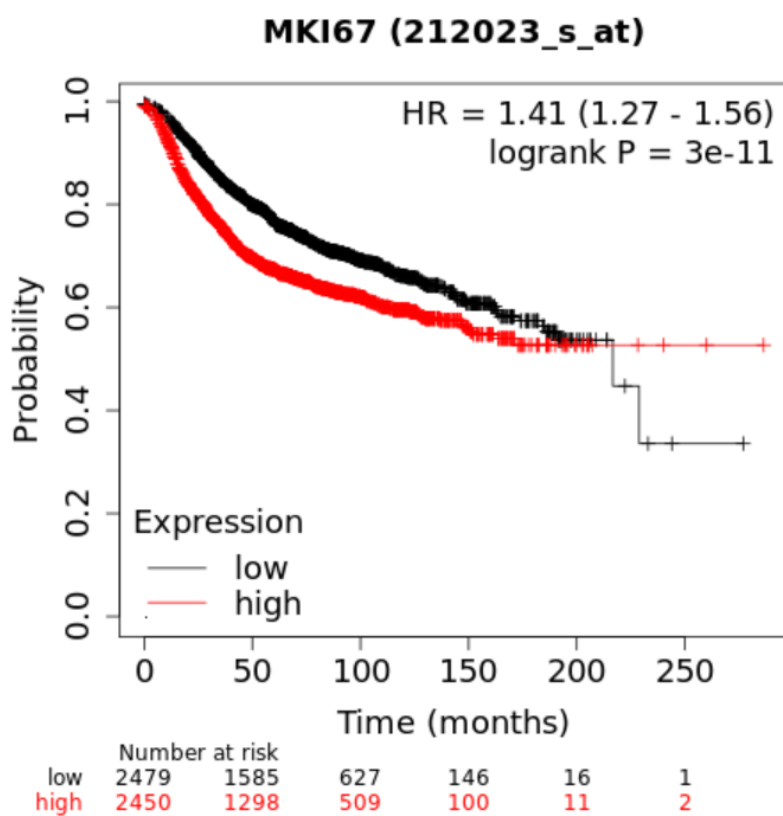


Рис.3.11. Біоінформатичний аналіз показників безрецидивної виживаності залежно від рівня експресії Ki-67, із використанням бази даних KM Plotter

ВИСНОВКИ

1. Проведено морфологічне дослідження зразків операційного матеріалу РМЗ. Визначено молекулярні підтипи зразків тканини у вибірці відповідно до значень експресії ER, PR та HER2/neu.

2. Продемонстровано зростання проліферативного потенціалу новоутворень молочної залози із зменшенням ступенем диференціювання, та у новоутворень більш агресивних (HER2 позитивного та Базального) молекулярних підтипів, а також із експресією HER2/neu. Виявлено зменшення проліферативної активності новоутворень в пухлинах, в яких фіксувалася позитивна експресія ER та PR.

3. Показано зменшення рівня експресії гену *MKI67* на рівні білка із віком хворих, та з збільшенням кількості пологів.

4. Не виявлено залежності між рівнем експресії Ki-67 та розміром новоутворень, статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів, кількістю абортів а також менопаузальним статусом.

5. Для валідації та перевірки отриманих статистичних результатів проведено біоінформатичний аналіз експресії Ki-67 в зразках РМЗ в залежності від досліджуваних клініко-патологічних характеристик. Виявлено вищі показники безрецидивної та загальної виживаності у пацієнтів із низькими рівнями експресії Ki-67.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Ghoncheh, M., Pournamdar, Z., and Salehiniya, H. (2016). Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 17(S3), 43–46.
<https://doi.org/10.7314/apjcp.2016.17.s3.43>
2. Stead, L. A., Lash, T. L., Sobieraj, J. E., Chi, D. D., Westrup, J. L., Charlot, M., Blanchard, R. A., Lee, J. C., King, T. C., and Rosenberg, C. L. (2009). Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast cancer research: BCR*, 11(2), R18.
<https://doi.org/10.1186/bcr2242>
3. Eiro, N., González, L., Martínez-Ordoñez, A., Fernandez-Garcia, B., González, L. O., Cid, S., Dominguez, F., Perez-Fernandez, R., and Vizoso, F. (2018). Cancer-associated fibroblasts affect breast cancer cell gene expression, invasion and angiogenesis. *Cellular oncology (Dordrecht)*, 41(4), 369–378.
<https://doi.org/10.1007/s13402-018-0371-y>
4. Howlader N., Noone AM, Krapcho M., et al. (1975-2014). *SEER Cancer Statistics Review*. National Cancer Institute, Bethesda, MD.
https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/
5. Macias, H., and Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology*, 1(4), 533–557.
<https://doi.org/10.1002/wdev.35>
6. Hassiotou, F., and Geddes, D. (2013). Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. *Clinical anatomy* (New York, N.Y.), 26(1), 29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>
7. Alex, A., Bhandary, E., and McGuire, K. P. (2020). Anatomy and Physiology of the Breast during Pregnancy and Lactation. *Advances in*

experimental medicine and biology, 1252, 3–7. https://doi.org/10.1007/978-3-030-41596-9_1

8. Obr, A. E., and Edwards, D. P. (2012). The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, 357(1-2), 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.030>

9. DeSantis, C., Siegel R., Bandi P., and Jemal A. (2011). Breast cancer statistics. *A cancer journal for clinicians*, 61(6), 409–418. <https://doi.org/10.3322/caac.20134>

10. Quinn, M., Wood H., Cooper N. (1991-2005). *Cancer Atlas of the United Kingdom and Ireland*, 68.

11. Barnard, M. E., Boeke, C. E., and Tamimi, R. M. (2015). Established breast cancer risk factors and risk of intrinsic tumor subtypes. *Biochimica et biophysica acta*, 1856(1), 73–85. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.002>

12. Cserni, G., Chmielik, E., Cserni, B., and Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 472(5), 697–703. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2301-9>

13. Sawaki, M., Shien, T., and Iwata, H. (2019). TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group). *Japanese journal of clinical oncology*, 49(3), 228–231. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyy182>

14. Chassagnon, G., Bennani, S., & Revel, M. P. (2017). Nouvelle classification TNM des cancers du poumon non à petites cellules [New TNM classification of non-small cell lung cancer]. *Revue de pneumologie clinique*, 73(1), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.pneumo.2016.12.006>

15. Kuhl C. K. (2015). The Changing World of Breast Cancer: A Radiologist's Perspective. *Investigative radiology*, 50(9), 615–628. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000166>

16. Orel, S. G., and Schnall, M. D. (2001). MR imaging of the breast for the detection, diagnosis, and staging of breast cancer. *Radiology*, 220(1), 13–30. <https://doi.org/10.1148/radiology.220.1.r01jl3113>

17. Desreux J. A. C. (2018). Breast cancer screening in young women. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 230, 208–211. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.05.018>
18. Walker R. A. (2008). Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *Journal of clinical pathology*, 61(6), 689–696. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.041830>
19. Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., and Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736–750. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>
20. Landmann, A., Farrugia, D. J., Zhu, L., Diego, E. J., Johnson, R. R., Soran, A., Dabbs, D. J., Clark, B. Z., Puhalla, S. L., Jankowitz, R. C., Brufsky, A. M., Ahrendt, G. M., McAuliffe, P. F., and Bhargava, R. (2018). Low Estrogen Receptor (ER)-Positive Breast Cancer and Neoadjuvant Systemic Chemotherapy: Is Response Similar to Typical ER-Positive or ER-Negative Disease. *American journal of clinical pathology*, 150(1), 34–42. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqy028>
21. Yip, C. H., and Rhodes, A. (2014). Estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Future oncology* (London, England), 10(14), 2293–2301. <https://doi.org/10.2217/fon.14.110>
22. Rajaram, P., Chandra, P., Ticku, S., Pallavi, B. K., Rudresh, K. B., and Mansabdar, P. (2017). Epidermal growth factor receptor: Role in human cancer. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*, 28(6), 687–694. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_534_16
23. Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G. N., and Ueno, N. T. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 136(2), 331–345. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2289-9>

24. Cheang, M. C., Chia, S. K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P. S., Parker, J. S., Perou, C. M., Ellis, M. J., and Nielsen, T. O. (2009). Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(10), 736–750. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp082>
25. Del Rosario Taco Sanchez, M., Soler-Monsó, T., Petit, A., Azcarate, J., Lasheras, A., Artal, C., Gil, M., Falo, C., Pla, M. J., and Matias-Guiu, X. (2019). Digital quantification of KI-67 in breast cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 474(2), 169–176. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2481-3>
26. Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., and Muñoz, M. (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 24 Suppl 2, S26–S35. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2015.07.008>
27. Sakorafas G. H., & Safioleas M. (2010). Breast cancer surgery: an historical narrative. Part II. 18th and 19th centuries. *European journal of cancer care*, 19(1), 6–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2008.01060>
28. Grebić, D., Pirjavec, A. Kustić, D., & Klarica Gembić T. (2021). Surgical treatment for breast cancer and axillary metastases: historical perspective. *Acta medico-historica adriatica : AMHA*, 19(1), 125–136. <https://doi.org/10.31952/amha.19.1.7>
29. Testa, A., Iannace C., & Di Libero L. (2014). Strengths of early physical rehabilitation programs in surgical breast cancer patients: results of a randomized controlled study. *European journal of physical and rehabilitation medicine*, 50(3), 275–284.
30. Bradley, J. A., and Mendenhall, N. P. (2018). Novel Radiotherapy Techniques for Breast Cancer. *Annual review of medicine*, 69, 277–288. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042716-103422>
31. Drăgănescu, M., and Carmocan, C. (2017). Hormone Therapy in Breast Cancer. *Chirurgia (Bucharest, Romania : 1990)*, 112(4), 413–417. <https://doi.org/10.21614/chirurgia.112.4.413>

32. Kapil, U., Bhadoria, A. S., Sareen, N., Singh, P., and Dwivedi, S. N. (2014). Reproductive factors and risk of breast cancer: A Review. *Indian journal of cancer*, 51(4), 571–576. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.175345>
33. Chen, Y. Y., and Wu, K. J. (2021). Zhonghua wai ke za zhi [*Chinese journal of surgery*], 59(2), 104–108. <https://doi.org/10.3760/cma.j.cn112139-20201013-00750>
34. Moragón, S., Di Liello, R., Bermejo, B., Hernando, C., Olcina, E., Chirivella, I., Lluch, A., Cejalvo, J. M., and Martínez, M. T. (2021). Fertility and breast cancer: A literature review of counseling, preservation options and outcomes. *Critical reviews in oncology/hematology*, 166, 103461. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103461>
35. Gosden, R., and Nagano, M. (2002). Preservation of fertility in nature and ART. *Reproduction (Cambridge, England)*, 123(1), 3–11. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230003>
36. Hončová V.eronika (2023). Cryopreservation of ovarian tissue as a method for fertility preservation in women. Kryokonzervace ovariální tkáně jako metoda pro zachování fertility u žen. *Ceska gynekologie*, 88(1), 44–51. <https://doi.org/10.48095/cccg202344>