

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПАТОЛОГІЇ, ОНКОЛОГІЇ  
І РАДІОБІОЛОГІЇ ім. Р. Є. КАВЕЦЬКОГО**

**СОБЧЕНКО СЕРГІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ**

УДК 616 – 006.6: 576.3: 616-037

**КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНЕ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ  
ЛАКТОФЕРИНУ ПРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

14.01.07 – онкологія



**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

**Науковий керівник** - академік НАН України, доктор медичних наук, професор  
**Чехун Василь Федорович**,  
завідувач відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії, директор Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

**Офіційні опоненти:** - доктор медичних наук, професор  
**Литвиненко Олександр Олександрович**,  
завідувач відділу радіоіндукованих онкологічних захворювань Інституту клінічної радіології ДУ «Національний центр радіаційної медицини НАМН України»;

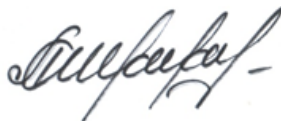
- доктор медичних наук, професор,  
**Гордійчук Прокіп Іванович**,  
завідувач кафедри онкології Національного університету охорони здоров'я України імені П.Л. Шупика МОЗ України.

Захист відбудеться 12 травня 2021 р. о 13 год. 30 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.155.01 в Інституті експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України (03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці ІЕПОР ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Автореферат розісланий «    » квітня 2021 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук



Л. М. Шлапацька

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** На сьогодні захворюваність на рак молочної залози (РМЗ), яка супроводжується гетерогенністю клінічних проявів пухлинного процесу, невпинно зростає, а показники смертності не мають тенденції до зниження як в Україні, так і в світі (Бюлетень національного канцер-реєстру України, 2019-2020; Смоланка І.І., 2019; Литвиненко, О. О. та ін., 2017, 2018; Bray F. et al., 2018; DeSantis C. E. et al., 2019). Шляхи пошуку вирішення цієї вкрай актуальної проблеми потребують нових підходів для з'ясування таких нагальних питань як рання діагностика, прогнозування перебігу хвороби, а також персоналізоване лікування хворих. Враховуючи зазначене, нові погляди на виникнення, розвиток та прогресію РМЗ обумовлені ідентифікацією змін вмісту, співвідношення та розподілу залізовмісних білків та їх рецепторів у нормальних та злоякісних клітинах (Чехун В.Ф. та співавт., 2010; Chekhun V.F. et al., 2016; Jung M. et al., 2019; Torti S. V. et al., 2020).

Відомо, що на клітинному і молекулярному рівні регуляція обміну заліза забезпечується через злагоджену дію залізовмісних білків, у тому числі білків-переносників. Перенесення заліза у зв'язаній з білками формі мінімізує його здатність брати участь в реакціях вільно-радикального окиснення, а отже знижує ймовірність оксидативного ушкодження клітин і тканин організму (Baker E.N. et al., 2009; Chekhun V.F. et al., 2017; Nakamura T. et al., 2019; Muhoberac B. B. et al., 2019). На сьогодні вже існує достатньо інформації про особливості метаболізму таких залізовмісних білків як феритин, трансферин, феропортин у жінок із злоякісними новоутвореннями молочної залози та пропозиції і перші кроки застосування отриманих даних у клінічній практиці (Gkouvatsos K. et al., 2012; Chekhun V.F. et al., 2017; Nagag, A. A. et al., 2018; Bitonto V. et al., 2020).

Найменш же вивченою у патогенезі, клінічному перебігу та прогнозі РМЗ залишається роль лактоферину (ЛФ). ЛФ – це залізовв'язуючий глікопротеїн родини трансферинів, який складається з одного поліпептидного ланцюга з молекулярною масою 76,8 кДа. Він містить 703 амінокислоти, які утворюють два гомологічних домена, N- та C- частки. Кожна частка несе певне функціональне навантаження і має по одному залізовв'язуючому центрі (Берлов М.Н. и др., 2011; Du Ming. et al., 2017; Sabra S. et al., 2020).

ЛФ є чи не єдиним прикладом білка з унікальним набором біологічних властивостей різного характеру. Рецептор ЛФ відіграє важливу роль у процесі інтерналізації ЛФ і полегшує адсорбцію іонів заліза, зв'язаних з ЛФ. Поряд з цим, ЛФ регулює концентрацію іонів заліза у крові і секретах, має антимікробну та антивірусну дію і тому його вважають одним із найбільш важливих імунних факторів молока. ЛФ бере безпосередню участь у захисних реакціях організму, а також може бути посередником при розвитку клітинного імунітету. ЛФ взаємодіє з поліамінами та гепарином. Крім того, ЛФ володіє антиоксидантною, імуномодулюючою та протипухлинною активністю (Legrand D. et al., 2004; Kruzel M. L. et al., 2017; Rosa L. et al., 2019; Cutone A. et al., 2020). Проникаючи у ядра клітин, він зв'язується із специфічними послідовностями ДНК і активує процеси транскрипції. Механізм дії ЛФ як фактора транскрипції не досліджений, а

потенційні гени-мішені на сьогодні не відомі. Однак, розвиток досліджень цього напрямку, ймовірно, з часом призведе до розуміння біологічної ролі унікальної властивості ЛФ – взаємодії з великою кількістю різних клітин.

Аспекти значення ЛФ у клінічному перебігу РМЗ практично не вирішені. Існують лише поодинокі і в той же час суперечливі повідомлення, які присвячені вивченню ЛФ у пухлинних клітинах хворих на РМЗ в системі *in vitro*. Серед них дані експериментальних досліджень, щодо здатності ЛФ підвищувати міграцію та інвазію клітин як тричі рецептор-позитивних, так і рецептор-негативних ліній РМЗ (Suzuki Y.A. et al., 2004). З іншого боку, показано, що ЛФ молока корів здатний зменшувати життєздатність клітин ліній HS578T та T47D на 47% і 54% відповідно, а також індукувати підвищення рівня апоптозу (Duarte D.C. et al., 2011; Pereira C.S. et al., 2019). Іншими дослідниками встановлено антиканцерогенну дію рекомбінантного ЛФ людини на пухлинні клітини в системі *in vitro* (Chekhun V.F. et al., 2015; Hu L. et al., 2016; Hwang S.M. et al., 2016).

Отже, до цього часу не існує певного погляду на роль ЛФ у патогенезі РМЗ: не визначені особливості кореляційних зв'язків між кількісними показниками ЛФ та клінічними, морфологічними і молекулярно-біологічними характеристиками РМЗ на різних стадіях його розвитку. Крім того, обмаль відомостей про значення ЛФ як критерію прогнозу клінічного перебігу захворювання, хоча, згідно сучасних тенденцій в онкології, діагностично-прогностичні критерії повинні ґрунтуватись на молекулярно-генетичних та імуногістохімічних маркерах, які відображають особливості розвитку пухлинного процесу на системному рівні.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами.** Дисертація виконана у відділі моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України відповідно до плану науково-дослідних робіт за такими темами: «Молекулярна епідеміологія металовмісних білків у взаємовідносинах пухлини та організму» (2012-2016 рр.; № державної реєстрації 0112U002197), «Роль лактоферину в ініціації та перебігу найбільш розповсюджених гормонзалежних злоякісних новоутворень» (2016-2018 рр., № держреєстрації 0115U005381), «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U002034).

**Мета дослідження.** Обґрунтувати клініко-патологічне та молекулярно-біологічне значення лактоферину при раку молочної залози шляхом дослідження його показників в системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі.

#### **Завдання дослідження:**

1. В експериментальній системі *in vitro* дослідити особливості експресії ЛФ у клітинах ліній РМЗ людини різного ступеня злоякісності з урахуванням їх молекулярного профілю.
2. Проаналізувати зв'язок показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих на РМЗ із клініко-патологічними ознаками пухлинного процесу.
3. Дослідити особливості експресії пухлинної та циркулюючої мікроРНК-214, що бере участь у регуляції ЛФ, враховуючи клініко-патологічні

характеристики у хворих на РМЗ.

4. Вивчити зв'язок показників експресії ЛФ у клінічному матеріалі хворих на РМЗ з молекулярно-біологічними особливостями пухлинних клітин та показниками загальної виживаності хворих.

5. Обґрунтувати доцільність використання показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих на РМЗ для прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу.

*Об'єкт дослідження:* клітинні лінії та клінічний матеріал хворих на РМЗ.

*Предмет дослідження:* вміст ЛФ у сироватці крові хворих та його експресія у клітинах РМЗ; зв'язок показників ЛФ з клінічними, морфологічними та молекулярно-біологічними характеристиками пухлин; можливість використання показників ЛФ в якості прогностичного маркера у хворих на РМЗ.

**Методи дослідження.** Експресію ЛФ у пухлинних клітинах у системі *in vitro* визначали за допомогою імуноцитохімічного методу. Рівень ЛФ у сироватці крові хворих досліджували з використанням методу твердофазного імуноферментного аналізу. Дослідження експресії ЛФ, рецепторів естрогенів (РЕ), прогестерону (РП), рецептора епідермального фактора росту (Her2/neu) і маркера проліферативної активності пухлин Ki-67 проводили на парафінових зрізах операційного матеріалу імуногістохімічним методом. Експресію мікроРНК у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ визначали за допомогою методу кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Достовірність відмінностей між показниками двох незалежних груп за кількісною ознакою оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента або U-критерію Манн-Уїтні. Оцінку зв'язку рівнів експресії досліджуваних маркерів із клініко-патологічними характеристиками РМЗ проводили з використанням коефіцієнту Пірсона. Виживаність хворих аналізували за методом Каплана-Мейєра, достовірність між кривими – з використанням логарифмічного рангового тесту. Достовірними вважали розбіжності при  $p < 0,05$ .

**Наукова новизна одержаних результатів.** На підставі комплексного дослідження в системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі вперше в Україні з'ясовано клініко-патологічне та молекулярно-біологічне значення ЛФ при РМЗ.

Доповнено наукові дані щодо зв'язку експресії ЛФ з молекулярним профілем клітин РМЗ різного ступеня злоякісності в експериментальній системі *in vitro*. Найбільші показники експресії ЛФ встановлено у клітинах РМЗ високого ступеня злоякісності ліній MDA-MB 231 та MDA-MB 468 ( $285,0 \pm 2,1$  та  $251,0 \pm 2,3$  балів відповідно), які характеризуються відсутністю експресії рецепторів стероїдних гормонів, високою проліферативною та інвазивною активністю та низькими адгезивними властивостями. Достовірно менший рівень експресії ЛФ ідентифіковано у клітинах низького ступеня злоякісності ліній T47D та MCF-7 ( $92,0 \pm 1,9$  та  $70,0 \pm 1,6$  балів відповідно,  $p < 0,05$ ), які є позитивними за експресією РЕ і РП, мають високі адгезивні властивості і низьку інвазивну активність.

Розширено наукові дані щодо асоціації порушень метаболізму залізов'язуючих білків в пухлинних клітинах та організмі хворих зі ступенем злоякісності РМЗ. Найвищий рівень ЛФ у сироватці крові та найбільшу кількість

пухлин із високим рівнем експресії ЛФ зафіксовано у хворих із протоковим РМЗ, низького ступеня диференціювання, базального молекулярного підтипу ( $p < 0,05$ ). Доведено, що висока експресія ЛФ у пухлинних клітинах низького ступеня диференціювання базального молекулярного підтипу РМЗ є наслідком порушень експресії циркулюючої та пухлинно-асоційованої мікроРНК-214.

Вперше встановлено зв'язок між показниками вмісту ЛФ як на рівні пухлини, так і на рівні організму з молекулярно-біологічними особливостями РМЗ. Доведено, що рівень ЛФ у сироватці крові та показники його експресії у пухлинних клітинах прямо корелюють з проліферативною активністю РМЗ ( $r = 0,57$  та  $r = 0,49$ , відповідно) та зворотно корелюють зі статусом експресії РЕ та РП ( $r = -0,53$  та  $r = -0,61$ , відповідно).

Доведена можливість використання показників експресії ЛФ у пухлинній тканині в якості прогностичного фактора виживаності хворих на РМЗ: 5-річна загальна виживаність хворих на РМЗ є значно гіршою у хворих з найбільш агресивним базальним молекулярним підтипом, пухлинні клітини яких експресують ЛФ, мають негативний статус експресії РЕ, РП та високий проліферативний потенціал.

**Практичне значення роботи.** На підставі комплексних експериментальних та клінічних досліджень обґрунтовано можливість використання показників експресії ЛФ та мікроРНК-214 для прогнозування агресивності перебігу РМЗ.

Розроблено спосіб прогнозування перебігу РМЗ шляхом імуногістохімічного дослідження показників експресії ЛФ у пухлинних клітинах операційного матеріалу, що дає можливість здійснювати високоточний прогноз агресивності перебігу пухлинного процесу. Це забезпечує можливість корекції схем терапії, а, отже, дозволяє покращити результати лікування та підвищити виживаність хворих, що особливо важливо для оцінки біологічної характеристики пухлин у жінок з тричі-негативним РМЗ.

Розроблено спосіб визначення ступеня злоякісності РМЗ шляхом дослідження показників експресії мікроРНК-214 у клітинах операційного матеріалу, що дає можливість здійснювати поглиблену характеристику пухлинного процесу в молочній залозі та дозволяє підвищити ефективність комплексного лікування хворих. Доведено, що визначення рівня експресії мікроРНК-214 у сироватці крові хворих на РМЗ може бути використано в якості малоінвазивного тесту для моніторингу перебігу пухлинного процесу.

Теоретично-експериментальні результати дисертаційної роботи впроваджені в клінічну практику згідно з інформаційними листами «Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози» (Інформац. лист / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, І.В. Шепеленко, Т.В. Борікун, С.В. Чехун, О.М. Ключов, С.О. Собченко // Київ. – МОЗ України. – 2016. - № 2016-191) та «Спосіб персоналізованого прогнозу агресивності перебігу раку молочної залози» (Інформац. лист / Лук'янова Н.Ю., Налескіна Л.А., Сторчай Д.М., Собченко С.О., Ключов О.М., Чехун В.Ф. // Київ. – МОЗ України. – 2018. - № 2018-354).

Результати проведеного дослідження можуть бути впроваджені у практичну роботу онкомамологічних відділень та патоморфологічних лабораторій

онкологічних закладів України, у лекціях лікарям та студентам біологічних факультетів та медичних університетів.

**Особистий внесок здобувача.** Дисертація є закінченим дослідженням, основна частина якого виконана безпосередньо автором. Мета, дизайн та план дослідження узгоджені з науковим керівником. Здобувачем особисто здійснено інформаційний пошук та аналіз сучасної наукової літератури з питань, які були об'єктом і предметом дослідження. Здобувач брав участь у виконанні експериментальної частини роботи, аналізі одержаних результатів і підготовці наукових публікацій до друку, самостійно проводив підбір і аналіз клінічного матеріалу, брав участь у проведенні досліджень, особисто проводив зіставлення клінічних даних із результатами імуногістохімічних досліджень. Автором проведено аналіз, теоретичне узагальнення і статистичну обробку одержаних результатів. Спільно з науковим керівником сформульовані основні положення та висновки дисертації.

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи представлені у вигляді усних і стендових доповідей на конференціях: «Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин» (Яремче, 2015), «XIII з'їзд онкологів та радіологів України» (Київ, 2016), «IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии» (Минск, 2016).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 15 наукових робіт, з яких 1 глава монографії, 5 статей у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України (у тому числі 2 статті у журналах, що входять до міжнародних наукометричних баз), 2 патенти України на корисну модель, 1 методичні рекомендації, 2 інформаційні листи про нововведення в системі охорони здоров'я та 4 тез у збірках наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертація обсягом 145 сторінок складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи дослідження», 3 розділів власних досліджень, розділу «Узагальнення та обговорення результатів дослідження», висновків, списку використаних джерел літератури, який налічує 174 посилань (у тому числі 58 кирилицею та 116 латиницею). Дисертація містить 29 рисунків і 23 таблиці.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**Матеріали та методи дослідження.** В основу дисертації покладено результати комплексних експериментальних і клінічних досліджень.

**Експериментальні дослідження** проводили на 4 лініях клітин РМЗ людини (T47D, MCF-7, MDA-MB-231 і MDA-MB-468), одержаних із колекції банку тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України.

Ступінь злоякісності клітинних ліній РМЗ оцінювали за такими молекулярно-біологічними характеристиками як рецепторний статус (профіль експресії PE, PP, Her2/neu), проліферативна активність (маркер проліферуючих клітин Ki-67), показники експресії маркерів міжклітинного адгезії (CD44, E- та N-кадгерин)

(Лук'янова Н.Ю., 2015, Чехун С.В., 2015, Яловенко Т.М., 2017, Андрійв А.А., 2018) та інвазивної активності. В результаті аналізу клітинних ліній РМЗ за ступенем злоякісності визначено, що клітинні лінії T47D та MCF-7 належать до низького ступеня злоякісності, оскільки характеризуються високим рівнем експресії рецепторів стероїдних гормонів, низькою інвазивною активністю та високими адгезивними властивостями. Клітинні лінії MDA-MB-231 та MDA-MB-468 були віднесені до високого ступеня злоякісності, оскільки не експресували рецептори стероїдних гормонів, характеризувалися середньою ( $0,1-0,3 \times 10^3$  клітин MDA-MB-231) та високою інвазивною активністю ( $>0,3 \times 10^3$  клітин MDA-MB-468), а також низькими адгезивними властивостями.

**Клінічні дослідження.** У дисертаційне дослідження включені результати клінічного обстеження і лікування 151 жінки, які знаходились на стаціонарному лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2013–2016 рр. і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях.

Стадію пухлинного процесу визначали згідно з міжнародними класифікаціями пухлин (TNM, 6 видання (2002 р.) та 7 видання (2009 р.)).

Згідно з даними історій хвороб, усім хворим проведено загальні клінічні, біохімічні, лабораторні обстеження, УЗД органів черевної порожнини, мамографію, рентгеноскопію органів грудної порожнини, пункційну біопсію пухлин молочної залози за стандартами діагностики і лікування онкологічних хворих, затверджених наказами МОЗ України № 140 від 27.07.1998 р., № 554 від 17.09.2007 р., № 645 від 30.07.2010 р. та № 396 від 30.06.2015 р.

*Таблиця 1*

### Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ I-II стадій

| Показники                             | Кількість хворих |      |
|---------------------------------------|------------------|------|
|                                       | п                | %    |
| Загальна кількість хворих             | 151              | 100  |
| Середній вік, роки                    | 56,5±9,6         |      |
| Коливання віку, роки                  | 28-89            |      |
| Менструальний цикл збережений         | 29               | 19,2 |
| Менопауза                             | 122              | 80,8 |
| Стадія I                              | 47               | 31,1 |
| Стадія II                             | 104              | 68,9 |
| Інфільтративний протоковий рак        | 101              | 66,9 |
| Інфільтративний дольковий рак         | 50               | 33,1 |
| Ступінь диференціювання G1 (високий)  | 42               | 27,8 |
| Ступінь диференціювання G2 (помірний) | 78               | 51,7 |
| Ступінь диференціювання G3 (низький)  | 31               | 20,5 |
| Люмінальний А                         | 81               | 53,6 |
| Люмінальний Б                         | 35               | 23,2 |
| Базальний                             | 35               | 23,2 |

Неоад'ювантну терапію хворим на РМЗ I-II стадій не проводили. Всім хворим проведено хірургічне лікування (квадрант- або лампектомія з регіональною лімфодисекцією, радикальна мастектомія за Маденом). В ад'ювантному режимі проводили поліхіміотерапію за схемами, які застосовують у хворих на РМЗ: CMF (циклофосфамід, метотрексат, флуороурацил), CAF (циклофосфамід, доксорубіцин, флуороурацил), 4-6 курсів; променеву терапію на післяопераційний рубець та зони регіонарного метастазування у сумарній дозі 42-44 Гр. Хворим із позитивною експресією гормональних рецепторів у видаленій пухлині молочної залози на тривалий час призначали гормональну терапію за прийнятими схемами (тамоксифен, інгібітори ароматази) залежно від індивідуальних клінічних даних.

*Метод твердофазного імуоферментного аналізу.* Визначення вмісту ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ було проведено методом твердофазного імуоферментного аналізу за допомогою автоматичного біохімічного та імуоферментного аналізатора Chem Well 2900 згідно із введеною програмою протоколу до наборів Human Lactoferrin AssayMax ELISA Kit (AssayPro, USA). Зразки сироватки крові для дослідження не містили ознак гемолізу та отримували відповідно до рекомендацій, зазначених в інструкціях до наборів.

*Морфологічні методи.* Для верифікації пухлинного процесу проведено гістологічне дослідження операційного матеріалу хворих на РМЗ. Загальну структуру пухлин оцінювали при перегляді гістологічних зрізів товщиною 4-5 мікрон, пофарбованих гематоксиліном та еозином. На зрізах, забарвлених гематоксиліном та еозином, верифікували клінічний діагноз за Міжнародною класифікацією пухлин молочної залози (2009) та оцінювали ступінь диференціювання РМЗ.

*Імуноцито- та імуногістохімічні методи.* У системі *in vitro* у клітинах РМЗ людини експресію молекулярних маркерів досліджували за допомогою імуногістохімічного методу. Імуногістохімічне дослідження ЛФ, PE, PP, Her2/neu і Ki-67 у клітинах РМЗ проводили на парафінових зрізах операційного матеріалу. В якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла, які є специфічними до ЛФ (клон JE49-60), PE (клон 1D5), PP (PgR636), Her2/neu (клон c-erbB-2), Е-кадгерину (клон NCH-38), N-кадгерину (клон CD235), CD44 (клон SP37) та Ki-67 (клон MIB-1). Для детекції реакції використовували систему візуалізації Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System (Thermo Scientific, USA). Оцінку експресії досліджуваних білків у клітинах культур і пухлин проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин за методом H-Score (McClelland R.A. et al., 1991). Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 1 до 100 балів – низький, від 101 до 200 балів – середній, від 201 до 300 балів — високий рівень експресії.

*Молекулярно-біологічні методи.* Експресію мікроРНК-214 досліджували за допомогою кількісної ПЛР у реальному часі з використанням TaqManMicroRNA Assay з праймерами на приладі Applied Biosystems 7500 HT Fast Real-Time PCR System.

Для виділення загальної РНК із сироватки крові та з парафінових блоків

операційного матеріалу використовували комерційний набір "RNeasy FFPE Kit" (QIAGEN, Germany). Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі "NanoDrop 2000c Spectrophotometer" (ThermoScientific, USA). кДНК синтезували з використанням набору для зворотної транскрипції TaqMan. Отриману внаслідок зворотної транскриптазної реакції кДНК використовували в кількісній ПЛР, яку проводили в трьох повторах за допомогою MaximaSYBRGreen/ROXqPCRMasterMix (ThermoScientific, USA) у 96-лункових планшетах (AppliedBiosystems, USA). В якості ендogenous контролю для нормалізації показників експресії мікроРНК в пухлинній тканині та сироватці хворих на РМЗ використовували мікроРНК RNU48. Послідовності праймерів для ПЛР в реальному часі були визначені за допомогою ресурсу <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/> та синтезовані компанією Metabion (Germany). Відносну експресію мікроРНК обраховували за методикою Livak K. (2008). Середнє для триплікатів граничне значення циклу (Ct) досліджуваної мікроРНК нормалізували відносно Ct ендogenous контролю (далі – у.о.). Зміну експресії мікроРНК в певну кількість разів порівняно з контролем обчислювали за формулами  $2^{-\Delta Ct}$ . Результати обробляли в програмі Microsoft Excel і представляли у графічному вигляді.

*Статистичні методи.* Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми GraphPad Prism, v.6.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) з урахуванням характеру розподілу отриманих даних. Порівняння двох незалежних груп за кількісною ознакою проводили з використанням t-критерій Стюдента або U-критерій Манн-Уїтні. Аналіз спряженості ознак проводили з використанням методу Хі-квадрат. Оцінку зв'язку експресії досліджуваних маркерів із клініко-патологічними характеристиками РМЗ проводили з використанням коефіцієнту кореляції Пірсона. Вживаність хворих аналізували за методом Каплана-Мейєра (log-rank test). Дані представлені у вигляді  $M \pm m$ , де  $M$  – середнє арифметичне,  $m$  – стандартна помилка середнього або у вигляді відсоткового співвідношення для відносних величин. Критичний рівень статистичної значимості приймали рівним 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

**Зв'язок експресії ЛФ з молекулярно-біологічними особливостями клітин РМЗ різного ступеня злоякісності в системі *in vitro*.** Імуноцитохімічне вивчення ЛФ у клітинах ліній РМЗ свідчить про гетерогенність його експресії. Найбільші показники експресії ЛФ відзначено у клітинах високого ступеня злоякісності ліній MDA-MB-231 та MDA-MB-468 ( $285,0 \pm 2,1$  та  $251,0 \pm 2,3$  балів H-score відповідно). Достовірно меншу експресію ЛФ ( $<100$  балів H-score) встановлено в обох досліджених лініях РМЗ низького ступеня злоякісності T47D та MCF-7 ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Статистична обробка одержаних результатів показала, що експресія ЛФ у досліджених лініях РМЗ прямо корелює з показниками проліферативної та інвазивної активності клітин, а також обернено співвідноситься з їх рецепторним статусом та адгезивними характеристиками (табл. 3).

Таблиця 2

**Експресія лактоферину в клітинах РМЗ різного ступеня злоякісності**

| Клітинна лінія | Ступінь злоякісності | Рівень експресії ЛФ (H-score, бали) |
|----------------|----------------------|-------------------------------------|
| T47D           | Низький              | 92,0±1,9                            |
| MCF-7          | Низький              | 70,0±1,6                            |
| MDA-MB 231     | Високий              | 285,0±2,1*                          |
| MDA-MB 468     | Високий              | 251,0±2,3*                          |

Примітка. \* -  $p < 0,05$  у порівнянні з клітинами низького ступеня злоякісності

Таблиця 3

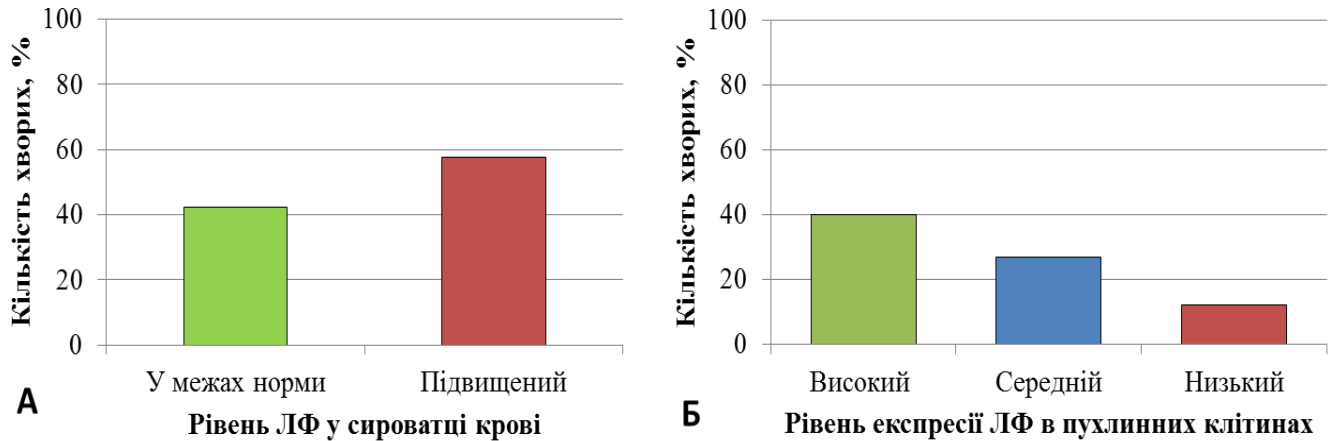
**Коефіцієнти кореляції між показниками експресії лактоферину та молекулярно-біологічними характеристиками клітин РМЗ**

| Показники                  | Значення коефіцієнта кореляції |            |
|----------------------------|--------------------------------|------------|
|                            | r                              | p          |
| ЛФ / РЕ                    | -0,57                          | $p < 0,05$ |
| ЛФ / РП                    | -0,49                          | $p < 0,05$ |
| ЛФ / Ki-67                 | 0,50                           | $p < 0,05$ |
| ЛФ / Адгезивні властивості | -0,46                          | $p < 0,05$ |
| ЛФ / Інвазивність          | 0,39                           | $p > 0,05$ |

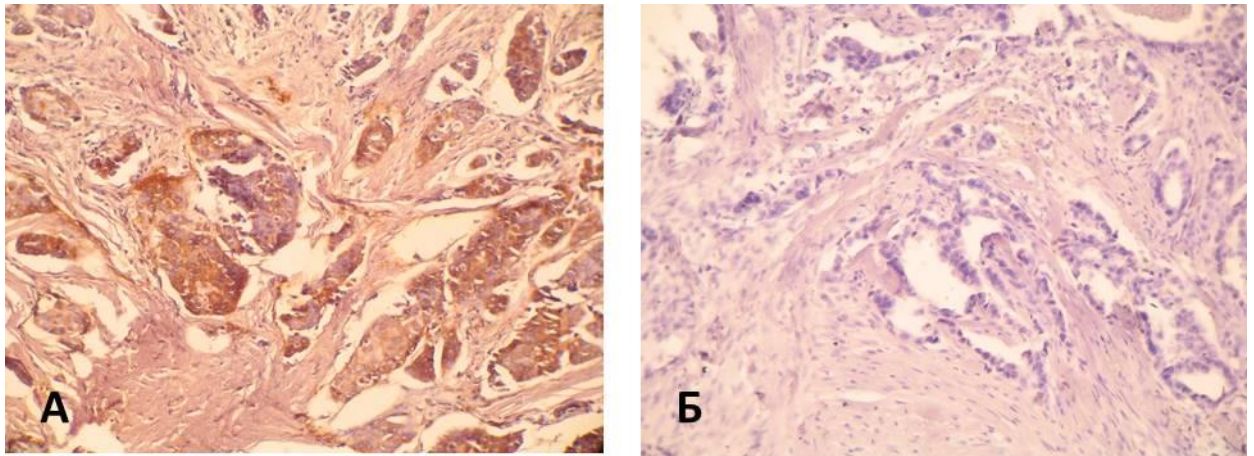
Отже, в дослідженнях *in vitro* нами встановлено зв'язок експресії ЛФ із молекулярним фенотипом та ступенем злоякісності клітин РМЗ. Визначено, що збільшення рівня експресії ЛФ асоціюється з відсутністю рецепторів стероїдних гормонів, високою проліферативною та інвазивною активністю, а також низькими адгезивними властивостями клітин. Отримані дані переконливо свідчать про зв'язок експресії ЛФ із потенціалом злоякісності клітин РМЗ.

**Дослідження показників ЛФ у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ.** Дослідження вмісту ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ I-II стадій виявило значну варіабельність показників цього маркера з індивідуальними коливаннями від 125,1 нг/мл до 3810 нг/мл (середній показник  $1486,7 \pm 427,6$  нг/мл). Показники ЛФ, які достовірно перевищували максимальні референтні значення, виявлено у 87 (57,6%) хворих на РМЗ, тоді як у 64 (42,4%) хворих вони були у межах референтних значень (рис.1А).

Аналіз результатів імуногістохімічного визначення експресії ЛФ у пухлинній тканині хворих на РМЗ показав, що частота пухлин із позитивною детекцією продукту реакції становила 79,0% (рис.2). Високий, середній та низький рівень експресії досліджуваного маркера констатовано у цитоплазмі клітин 40%, 27% та 12% хворих, відповідно, серед всієї когорти хворих на РМЗ (рис.1Б).



**Рис.1.** Розподіл хворих на РМЗ з урахуванням показників ЛФ у сироватці крові (А) та пухлинній тканині (Б)



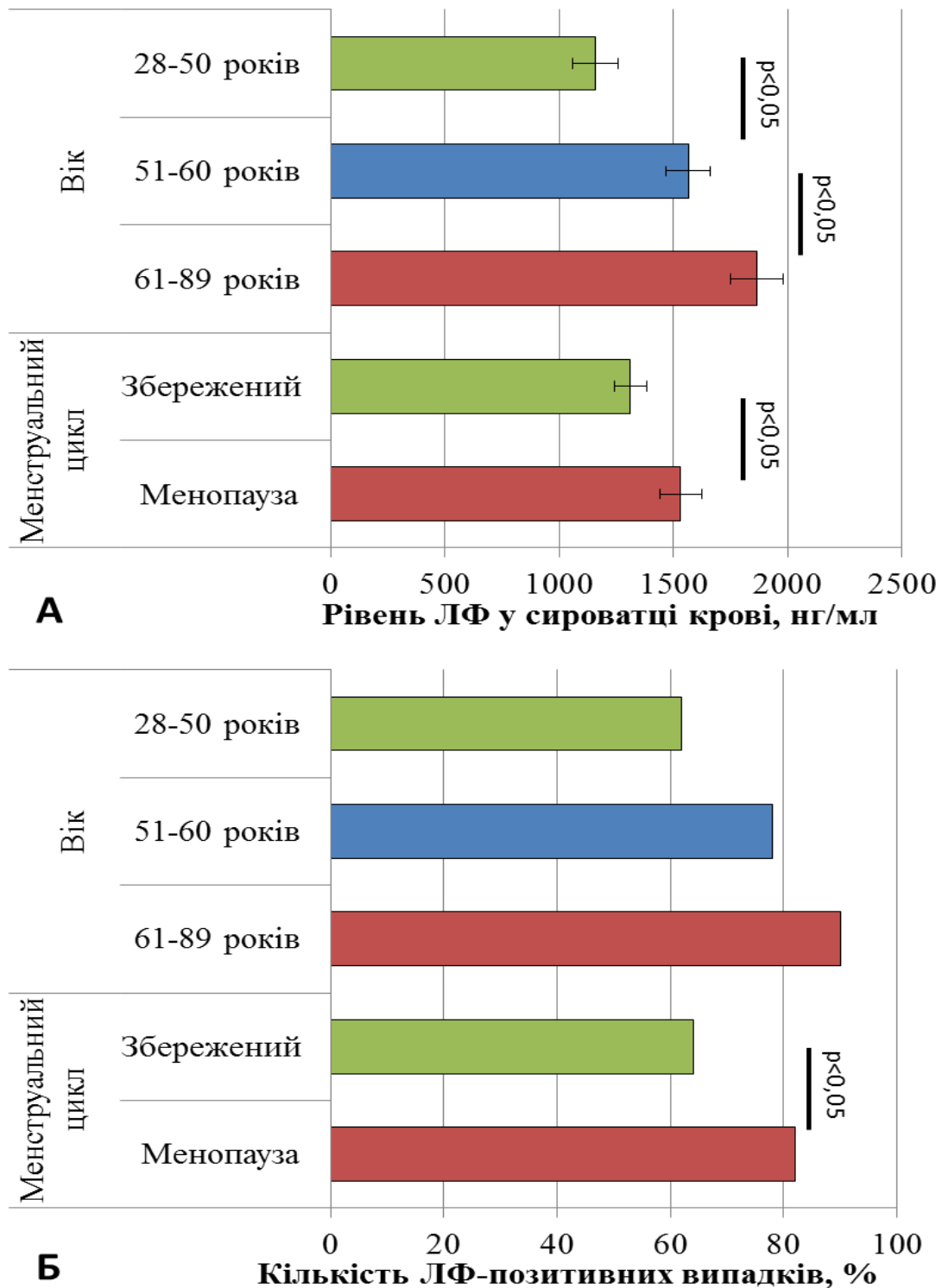
**Рис.2** Наявність (А) та відсутність (Б) експресії ЛФ у клітинах РМЗ. Імуногістохімія, дофарбовано гематоксіліном,  $\times 400$

Таким чином, встановлена варіабельність експресії ЛФ у пухлинних клітинах та ідентифіковані відмінності вмісту ЛФ у сироватці крові більшості досліджених хворих є підтвердженням участі цього протеїну у патогенезі РМЗ.

**Вивчення зв'язку показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих на РМЗ із клініко-патологічними особливостями пухлинного процесу.** При аналізі зв'язку між показниками вмісту ЛФ у сироватці крові, експресії даного протеїну в пухлинах із клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу нами виявлено ряд достовірних закономірностей. Зокрема, встановлено, що рівень ЛФ у сироватці крові достовірно збільшувався з підвищенням віку хворих, а також залежав від стану репродуктивної функції пацієнток на РМЗ (рис. 3А). Найбільші показники вмісту сироваткового ЛФ відзначено у хворих на РМЗ віком понад 60 років, що знаходились у стані менопаузи ( $1311,7 \pm 69,6$  та  $1531,8 \pm 92,7$  нг/мл відповідно).

При аналізі показників експресії ЛФ у пухлинних клітинах не визначено зв'язку між експресією ЛФ у пухлинних клітинах залежно від віку хворих на РМЗ. Проте, виявлено достовірно меншу кількість позитивних пухлин за експресією

досліджуваного маркера у хворих зі збереженою менструальною функцією (64% хворих), ніж у хворих, що знаходились у менопаузі (82% хворих) (рис. 3Б).



**Рис. 3.** Рівень ЛФ у сироватці крові (А) та наявність експресії ЛФ у пухлинній тканині (Б) хворих на РМЗ залежно від віку і менструальної функції

Встановлені суттєві зміни показників ЛФ у хворих постменопаузального

віку співпадають з даними наукової літератури і є підтвердженням ключової ролі естрогенів у регуляції синтезу цього протеїну (Ward, P.P. et al, 2006; Wulaningsih W. et al, 2015).

Оцінюючи рівень ЛФ у сироватці крові нами також встановлено, що його вміст був у 1,5 разу ( $p < 0,05$ ) вищим у хворих на протоковий РМЗ порівняно з таким у хворих на дольковий РМЗ (табл. 4). У хворих із низьким ступенем диференціювання РМЗ рівень сироваткового ЛФ був у 1,2 ( $p < 0,05$ ) та 1,3 ( $p < 0,05$ ) рази більшим порівняно з відповідними показниками пацієнтів із помірним та високим ступенем диференціювання новоутворень. У хворих із люмінальним А підтипом РМЗ показники ЛФ у сироватці крові були у 1,3 ( $p < 0,05$ ) та 2,0 ( $p < 0,05$ ) разу меншими, ніж у хворих із люмінальним Б та базальним підтипом новоутворень (табл. 4).

Таблиця 4

**Показники сироваткового та пухлинного лактоферину залежно від клініко-патологічних особливостей РМЗ**

| Характеристики                                               | Показники ЛФ                     |                                                     |                                                    |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
|                                                              | Рівень в сироватці крові (нг/мл) | Рівень експресії в пухлинній тканині (бали H-Score) | Кількість хворих із ЛФ-позитивними пухлинами (п/%) |
| <b>Стадія РМЗ за TNM (категорія Т)</b>                       |                                  |                                                     |                                                    |
| I                                                            | 1595,5±78,3                      | 242,5±13,0                                          | 39/83,0                                            |
| II                                                           | 1412,2±55,5                      | 252,0±19,5                                          | 79/76,0                                            |
| <b>Метастази у регіонарні лімфатичні вузли (категорія N)</b> |                                  |                                                     |                                                    |
| N0                                                           | 1546,8±122,5                     | 236,2±12,6                                          | 77/74,8                                            |
| N1                                                           | 1278,5±195,5                     | 252,0±10,7                                          | 35/83,3                                            |
| Nx                                                           | -                                | 231,0±14,5                                          | 6/100                                              |
| <b>Гістологічний тип</b>                                     |                                  |                                                     |                                                    |
| Інфільтративний протоковий рак                               | 1650,0±75,3*                     | 246,3±11,0                                          | 92/91,1*                                           |
| Інфільтративний дольковий рак                                | 1072,0±123,4                     | 214,0±13,0*                                         | 36/72,0                                            |
| <b>Ступінь диференціювання</b>                               |                                  |                                                     |                                                    |
| G1 (високий)                                                 | 1350,0±46,5                      | 143,5±10,5                                          | 29/69,0                                            |
| G2 (помірний)                                                | 1477,6±57,4                      | 182,3±8,4*                                          | 62/79,0                                            |
| G3 (низький)                                                 | 1785,2±76,8*                     | 264,5±10,5*                                         | 28/90,3*                                           |
| <b>Молекулярний підтип</b>                                   |                                  |                                                     |                                                    |
| Люмінальний А                                                | 1078,7±77,1                      | 178,0±11,3                                          | 55/67,9                                            |
| Люмінальний Б                                                | 1388,5±62,1*                     | 210,0±10,6                                          | 29/82,9                                            |
| Базальний                                                    | 2161,5±90,4*                     | 254,0±9,7*                                          | 34/97,1*                                           |

Примітка. \*  $p < 0,05$  у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РМЗ даної категорії

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження дозволив встановити найбільшу частоту ЛФ-позитивних новоутворень у хворих із протоковим РМЗ,

ніж у пацієнтів із дольковим РМЗ (91,1% та 72,0% відповідно) ( $p < 0,05$ ) (табл. 4). Кількість хворих із низькодиференційованими новоутвореннями, які були позитивні за експресією ЛФ, становила 90,3%, що на 11% та 21% більше числа пацієнтів із ЛФ-позитивними помірно- та високодиференційованими пухлинами ( $p < 0,05$ ). Низький рівень експресії ЛФ ( $< 100$  балів) зафіксовано у пухлинах 55,2% та 22,6% хворих на РМЗ високого та помірного ступеня диференціювання, в той час як в усіх досліджених випадках низькодиференційованого РМЗ визначено високий рівень експресії ЛФ ( $> 200$  балів) (табл.4). Меншу частоту ЛФ-позитивних новоутворень детектовано у хворих із люмінальним А та люмінальним Б молекулярним підтипом РМЗ (67,9% та 82,9% хворих відповідно) порівняно з хворими із базальним молекулярним підтипом (97,1%) ( $p < 0,05$ ) (табл. 4). Слід відзначити, що пухлини базального молекулярним підтипу РМЗ характеризувалися лише високим рівнем експресії ЛФ ( $> 200$  балів).

Достовірної різниці показників ЛФ у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ залежно від стадії пухлинного процесу та наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів не виявлено (табл. 4).

Встановлені відмінності у показниках ЛФ у сироватці крові та в пухлинній тканині хворих із різними клініко-патологічними характеристиками РМЗ стали підґрунтям для проведення кореляційного аналізу, результати якого подані в табл. 5.

Таблиця 5

**Зв'язок показників експресії лактоферину з клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ**

| Пари кореляцій                                        | Рівень ЛФ у сироватці крові | Рівень експресії ЛФ у пухлинній тканині |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|
|                                                       | <b>r</b>                    |                                         |
| Стадія                                                | 0,18 ( $p > 0,05$ )         | 0,14 ( $p > 0,05$ )                     |
| Наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах | 0,21 ( $p > 0,05$ )         | 0,23 ( $p > 0,05$ )                     |
| Гістологічний підтип                                  | 0,49 ( $p < 0,05$ )         | 0,57 ( $p < 0,05$ )                     |
| Ступінь диференціювання                               | - 0,54 ( $p < 0,05$ )       | -0,62 ( $p < 0,05$ )                    |
| Молекулярний підтип                                   | 0,61 ( $p < 0,05$ )         | 0,59 ( $p < 0,05$ )                     |

Таким чином, достовірне підвищення показників ЛФ у пухлинній тканині та сироватці крові відмічено у хворих на протоковий РМЗ низького ступеня диференціювання, базального молекулярного підтипу, який за клініко-патологічними показниками характеризується високим ступенем злоякісності.

**Особливості експресії пухлинної та циркулюючої мікроРНК-214, що бере участь у регуляції експресії ЛФ, у хворих на РМЗ.** З метою виявлення епігенетичних порушень регуляції експресії ЛФ було проведено вивчення особливостей експресії мікроРНК-214 у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ (табл. 6). Встановлено, що показники експресії мікроРНК-214 у

пухлинній тканині прямо корелюють з її рівнем у сироватці крові хворих на РМЗ ( $r = 0,65$ ). Найменші показники експресії мікроРНК-214 ідентифіковано у сироватці крові та пухлинній тканині пацієнток старше 60 років ( $3,6 \pm 0,4$  та  $3,4 \pm 0,3$  у.о. відповідно), що знаходились у стані менопаузи ( $6,5 \pm 0,4$  та  $3,1 \pm 0,3$  у.о. відповідно).

Таблиця 6

**Рівень експресії циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 залежно від клініко-патологічних особливостей РМЗ**

| Характеристик<br>и                                           | Рівень мікроРНК-214, у.о.                             |                                                         |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|                                                              | Рівень експресії<br>мікроРНК-214<br>у сироватці крові | Рівень експресії<br>мікроРНК-214<br>у пухлинній тканині |
| <b>Вік</b>                                                   |                                                       |                                                         |
| 28-50 років                                                  | $7,7 \pm 0,3$                                         | $8,4 \pm 0,4$                                           |
| 51-60 років                                                  | $5,2 \pm 0,4^*$                                       | $5,3 \pm 0,2$                                           |
| 61-89 років                                                  | $3,6 \pm 0,4^*$                                       | $3,4 \pm 0,3^*$                                         |
| <b>Менструальний цикл</b>                                    |                                                       |                                                         |
| Збережений                                                   | $8,0 \pm 0,5$                                         | $8,7 \pm 0,2$                                           |
| Менопауза                                                    | $6,5 \pm 0,4^*$                                       | $3,1 \pm 0,3^*$                                         |
| <b>Стадія РМЗ за TNM (категорія T)</b>                       |                                                       |                                                         |
| I                                                            | $4,9 \pm 0,4$                                         | $8,0 \pm 0,5$                                           |
| II                                                           | $5,3 \pm 0,7$                                         | $7,7 \pm 0,4$                                           |
| <b>Метастази у регіонарні лімфатичні вузли (категорія N)</b> |                                                       |                                                         |
| N0                                                           | $5,1 \pm 0,4$                                         | $7,5 \pm 0,3$                                           |
| N1                                                           | $4,7 \pm 0,8$                                         | $7,4 \pm 0,6$                                           |
| Nx                                                           | -                                                     | $8,0 \pm 0,4$                                           |
| <b>Гістологічний тип</b>                                     |                                                       |                                                         |
| Інфільтративний<br>протоковий рак                            | $4,2 \pm 0,2$                                         | $5,2 \pm 0,3$                                           |
| Інфільтративний<br>дольковий рак                             | $4,5 \pm 0,4$                                         | $6,0 \pm 0,4^*$                                         |
| <b>Ступінь диференціювання</b>                               |                                                       |                                                         |
| G1 (високий)                                                 | $7,2 \pm 0,4$                                         | $8,2 \pm 0,3$                                           |
| G2 (помірний)                                                | $5,6 \pm 0,3^*$                                       | $6,4 \pm 0,1$                                           |
| G3 (низький)                                                 | $3,4 \pm 0,2^*$                                       | $4,2 \pm 0,3^*$                                         |
| <b>Молекулярний підтип</b>                                   |                                                       |                                                         |
| Люмінальний А                                                | $7,5 \pm 0,5$                                         | $8,1 \pm 0,5$                                           |
| Люмінальний Б                                                | $4,6 \pm 0,3^*$                                       | $6,1 \pm 0,4$                                           |
| Базальний                                                    | $2,9 \pm 0,4^*$                                       | $3,4 \pm 0,2^*$                                         |

Примітка. \*  $p < 0,05$  у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РМЗ даної категорії

Виявлено, що рівні експресії циркулюючої та пухлинно-асоційованої мікроРНК-214 були достовірно більшими у хворих із високим ступенем диференціювання РМЗ ( $7,2 \pm 0,4$  та  $8,2 \pm 0,3$  у.о.) ніж у пацієнтів із новоутвореннями помірного ( $5,6 \pm 0,3$  та  $6,4 \pm 0,1$  у.о.) та низького ступеня диференціювання ( $3,4 \pm 0,2$  та  $4,2 \pm 0,3$  у.о.), у хворих із люмінальним А підтипом РМЗ ( $7,5 \pm 0,5$  та  $8,5 \pm 0,5$  у.о.) порівняно з пацієнтками з люмінальним Б ( $4,6 \pm 0,3$  та  $6,1 \pm 0,4$  у.о.) та базальним підтипами пухлин ( $2,9 \pm 0,4$  та  $3,4 \pm 0,2$  у.о. відповідно). Встановлено, що показники експресії мікроРНК-214 у пухлинній тканині прямо корелюють з її рівнем у сироватці крові хворих на РМЗ ( $r = 0,65$ ). Аналіз зв'язку показників циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 із клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ дозволив визначити деякі достовірні кореляції (табл. 7).

Таблиця 7

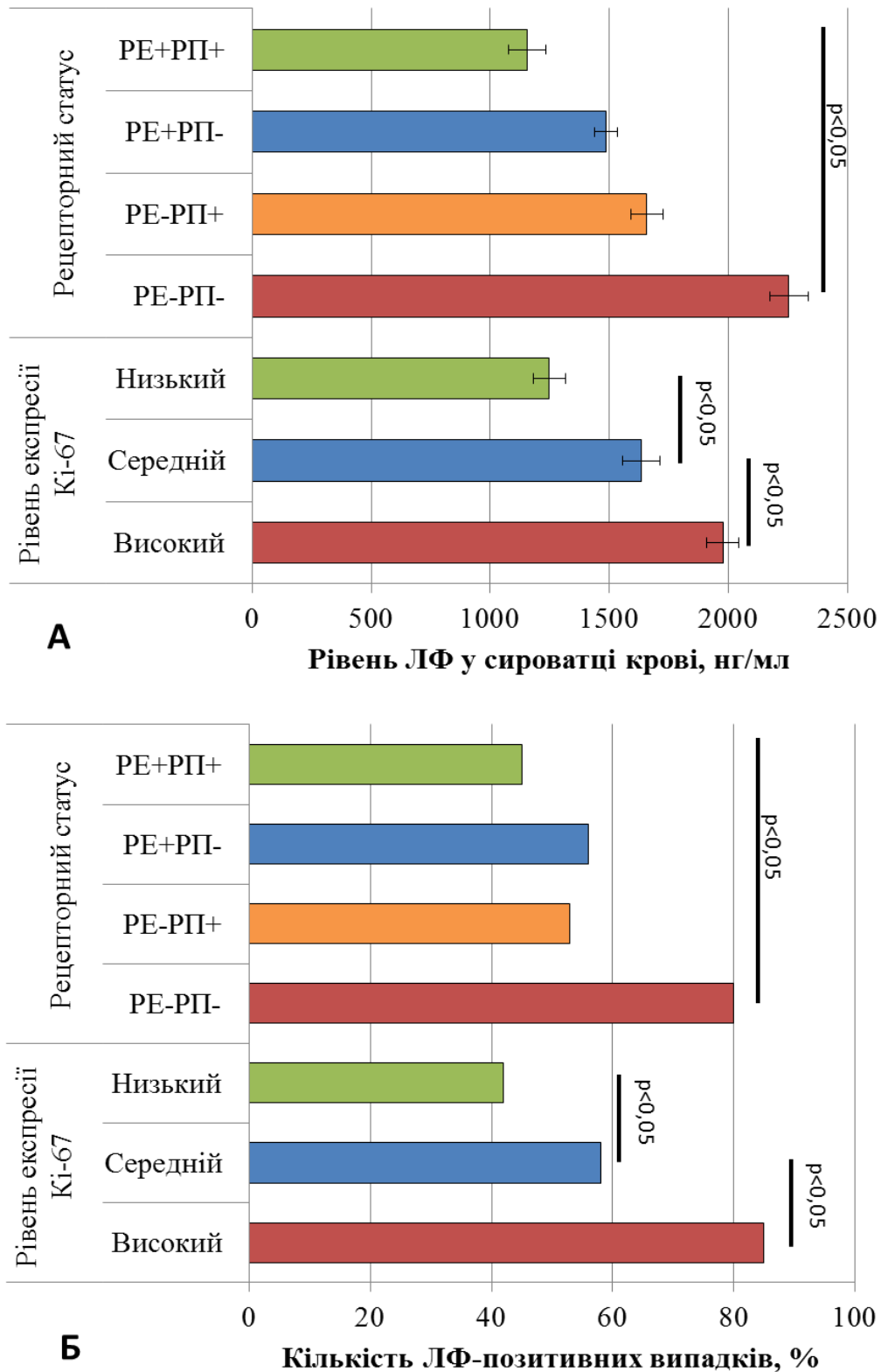
**Зв'язок рівня експресії циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 з основними клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ**

| Пари кореляцій                                        | Рівень експресії мікроРНК-214 в сироватці крові | Рівень експресії мікроРНК-214 в пухлинній тканині |
|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
|                                                       | r                                               |                                                   |
| Вік                                                   | -0,57 (p<0,05)                                  | -0,44 (p<0,05)                                    |
| Репродуктивна функція                                 | -0,56 (p<0,05)                                  | -0,49 (p<0,05)                                    |
| Стадія                                                | 0,13 (p>0,05)                                   | 0,18 (p>0,05)                                     |
| Наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах | 0,27 (p>0,05)                                   | 0,23 (p>0,05)                                     |
| Гістологічний підтип                                  | - 0,50 (p<0,05)                                 | - 0,57 (p<0,05)                                   |
| Ступінь диференціювання                               | 0,67 (p<0,05)                                   | 0,59 (p<0,05)                                     |
| Молекулярний підтип                                   | - 0,58 (p<0,05)                                 | -0,61 (p<0,05)                                    |

Таким чином, нами встановлено, що високий рівень експресії ЛФ у клітинах РМЗ низького ступеня диференціювання базального молекулярного підтипу є наслідком порушень експресії циркулюючої та пухлинно-асоційованої мікроРНК-214. Отримані дані вказують на ключову роль мікроРНК-214 у механізмах порушень експресії ЛФ при РМЗ та є підтвердженням її участі у формуванні ступеня злоякісності пухлини.

**Залежність показників експресії ЛФ від статусу експресії деяких молекулярно-біологічних маркерів клітин РМЗ.** Враховуючи отримані дані щодо зв'язку показників вмісту ЛФ у сироватці крові та статусу експресії ЛФ у пухлинній тканині із молекулярним підтипом РМЗ, наступним етапом досліджень було з'ясування закономірностей між наявністю цього протеїну в клінічному матеріалі хворих та деякими ключовими маркерами, що визначають молекулярний підтип пухлини – РЕ, РП і Ki-67. Як видно з даних, наведених на рис.4, найбільш високий рівень ЛФ виявлено у сироватці крові хворих на РМЗ із негативним

рецепторним статусом стероїдних гормонів пухлин порівняно із таким у пацієнтів, пухлини яких експресують обидва досліджувані рецептори (РЕ і РП) ( $2254,3 \pm 82,6$  проти  $1156,6 \pm 78,0$  нг/мл,  $p < 0,05$ ).



**Рис. 4.** Рівень ЛФ у сироватці крові (А) та наявність експресії ЛФ у пухлинній тканині (Б) хворих на РМЗ залежно від рецепторного статусу та проліферативної активності новоутворень

За наявності експресії одного із рецепторів стероїдних гормонів вміст ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ знаходився у діапазоні від 1630 до 2280 нг/мл. У хворих на РМЗ із високою та середньою проліферативною активністю пухлинних клітин, яка визначалась за рівнем експресії Ki-67, вміст сироваткового ЛФ був у 1,6 ( $p < 0,05$ ) та 1,3 ( $p < 0,05$ ) разу вищим порівняно із таким у пацієнтів із новоутвореннями, що мали низький проліферативний потенціал (рис. 4).

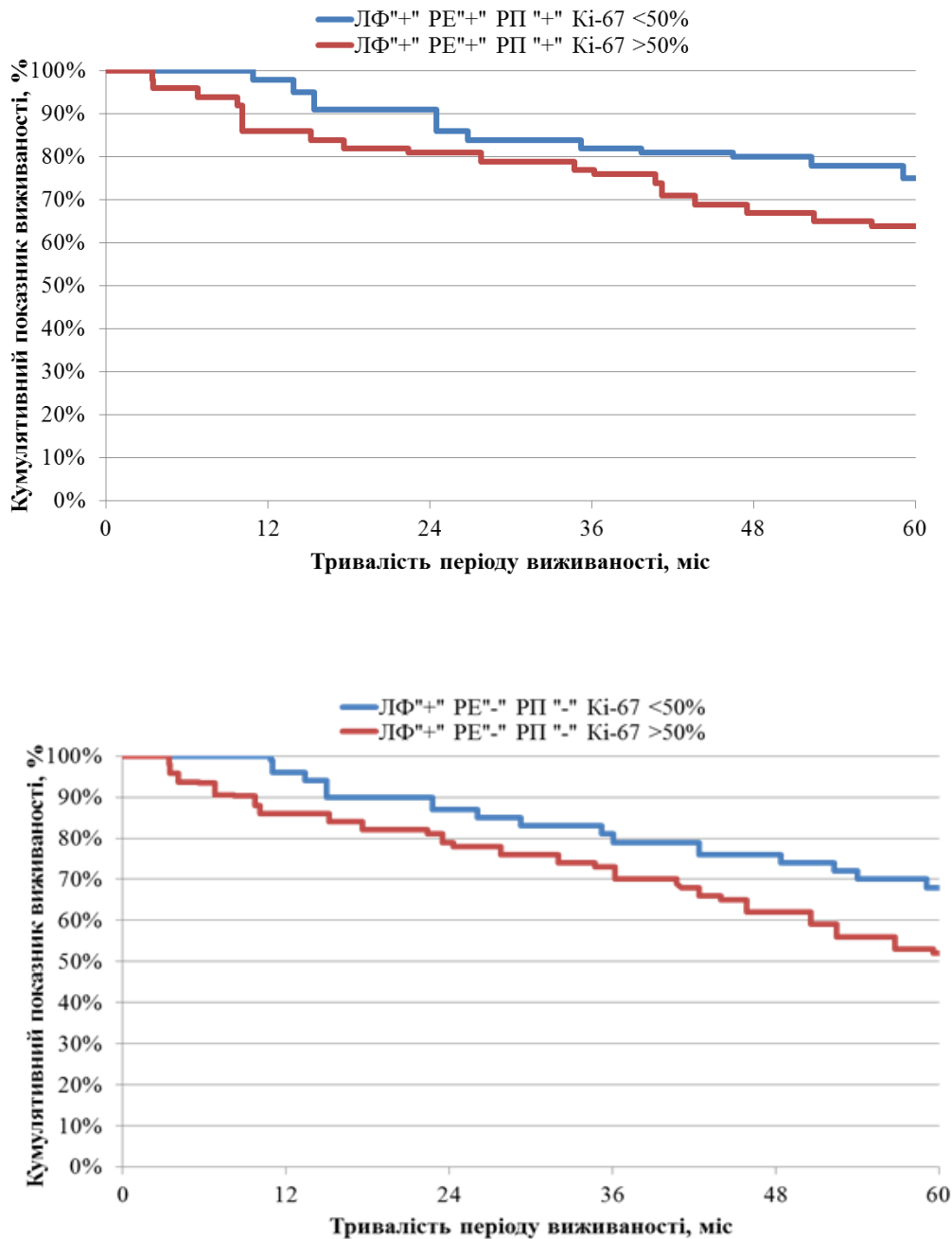
Аналогічну спрямованість закономірностей нами виявлено при аналізі зв'язку показників експресії ЛФ у пухлинних клітинах із рецепторним статусом та проліферативною активністю РМЗ. Найбільшу кількість ЛФ-негативних новоутворень визначено у хворих на РМЗ з наявністю у пухлинних клітинах експресії обох рецепторів стероїдних гормонів (45,0 % випадків) та за наявності експресії ER (56,3 % випадків) ( $p < 0,05$ ). З'ясовано, що експресія ЛФ більш характерна для новоутворень РМЗ із високим або середнім рівнем експресії Ki-67 у пухлинних клітинах ( $p < 0,05$ ) (рис. 4).

При співставленні показників рівня експресії ЛФ у пухлинних клітинах із рецепторним статусом і проліферативною активністю РМЗ виявлено, що високий рівень експресії ЛФ ( $> 200$  балів) визначається лише у новоутвореннях із негативним рецепторним статусом (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>) та високою експресією Ki-67. Статистичний аналіз дозволив встановити, що підвищення показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах прямо корелює з проліферативною активністю РМЗ ( $r = 0,57$  та  $r = 0,49$ , відповідно) та зворотно корелює зі статусом експресії рецепторів стероїдних гормонів новоутворень ( $r = -0,53$  та  $r = -0,61$ , відповідно).

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії ЛФ зі статусом експресії RE і RP, а також проліферативною активністю новоутворень, було проаналізовано загальну виживаність хворих на РМЗ з урахуванням показників експресії зазначених маркерів. Як видно з наведених даних (рис.5), достовірно зниження показників 5-річної загальної виживаності на 16,9%, встановлено у хворих, пухлинні клітини яких експресують ЛФ, мають негативний статус експресії RE, RP та високий проліферативний потенціал (експресія Ki-67 у понад 50% пухлинних клітин), ніж у хворих із молекулярним профілем пухлини ЛФ<sup>+</sup>, RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup> та низьким проліферативним потенціалом (експресія Ki-67 у менш ніж 50% пухлинних клітин). Натомість у хворих з позитивним статусом експресії рецепторів стероїдних гормонів за наявності ЛФ-позитивних новоутворень виявлено лише тенденцію до зниження показників 5-річної загальної виживаності хворих в залежності від їх проліферативного потенціалу.

Таким чином, ми встановили зв'язок показників ЛФ з молекулярним профілем РМЗ. Найвищий рівень ЛФ зареєстровано у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих із рецептор-негативним (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>) РМЗ, що відрізняється високою проліферативною активністю. Встановлено, що найменша 5-річна загальна виживаність спостерігається серед хворих на РМЗ за наявності експресії ЛФ у рецептор-негативних пухлинних клітинах на тлі високої експресії Ki-67. Отримані результати вказують, що ЛФ може бути використаний в якості об'єктивного критерію визначення агресивності перебігу базального підтипу

РМЗ, що дозволить забезпечити поліпшення результатів лікування цього контингенту хворих.



**Рис. 5.** Загальна виживаність хворих на РМЗ залежно від експресії ЛФ у пухлинній тканині, статусу експресії РЕ, РП та проліферативної активності пухлинних клітин (оцінка за Капланом-Мейером, log-rank тест -  $p < 0,05$ )

Підсумовуючи результати комплексного дослідження у системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі, можемо стверджувати, що нами з'ясовано ряд нових наукових аспектів щодо клініко-патологічного та молекулярно-біологічного значення ЛФ при РМЗ. Обґрунтовано можливість використання показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах для інтегральної оцінки та поглибленої характеристики пухлинного процесу у молочній залозі. Виявлені кореляції між показниками ЛФ і мікроРНК-214 у пухлинних клітинах та сироватці крові хворих

з такими показниками злоякісності РМЗ як ступінь диференціювання новоутворень, їх рецепторний статус та проліферативний потенціал свідчать про потенційну можливість його використання для прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу.

## ВИСНОВКИ

Одним із пріоритетних завдань фундаментальної онкології є поглиблене вивчення біології пухлинних клітин для пошуку додаткових діагностичних та прогностичних маркерів РМЗ. Доведено, що розвиток та прогресія РМЗ супроводжується ремоделюванням протеїнів-регуляторів обміну заліза, які відіграють важливу роль у здійсненні процесів диференціювання, інвазії, проліферації, міграції та апоптозу. Поглиблене дослідження змін показників ЛФ у сироватці крові хворих та у пухлинному вогнищі залежно від клініко-патологічних та молекулярно-біологічних особливостей РМЗ стане підґрунтям для розробки підходів до прогнозування перебігу злоякісного процесу і планування індивідуалізованого лікування.

1. В експериментальній системі *in vitro* визначено, що рівень експресії ЛФ асоціюється зі ступенем злоякісності клітинних ліній РМЗ. Найбільші показники експресії ЛФ виявлено у клітинах високого ступеня злоякісності ліній MDA-MB-231 та MDA-MB-468 ( $285,0 \pm 2,1$  і  $251,0 \pm 2,3$  балів відповідно), порівняно з такими у клітинах низького ступеня злоякісності ліній T47D та MCF-7 ( $92,0 \pm 1,9$  та  $70,0 \pm 1,6$  балів відповідно). Встановлено, що експресія ЛФ у клітинах ліній РМЗ різного ступеня злоякісності прямо корелює з проліферативною та інвазивною активністю клітин ( $r = 0,50$  та  $r = 0,39$   $p < 0,05$  відповідно), а також обернено корелює з експресією PE ( $r = -0,57$ ,  $p < 0,05$ ), РП ( $r = -0,49$ ;  $p < 0,05$ ) і адгезивними властивостями клітин ( $r = -0,46$ ;  $p < 0,05$ ).

2. Рівень ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ знаходиться в межах від 125,1 нг/мл до 3810 нг/мл та достовірно перевищує максимальні референтні значення ( $p < 0,05$ ) у 57,6% випадках. Найвищі показники вмісту ЛФ у сироватці крові частіше за все виявляли у жінок похилого віку (понад 60 років), що знаходились у стані менопаузи, з інфільтративним протоковим РМЗ ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,05$ ), низького ступеня диференціювання ( $r = -0,54$ ;  $p < 0,05$ ) та базального молекулярного підтипу ( $r = -0,61$ ;  $p < 0,05$ ).

3. Встановлено гетерогенність експресії ЛФ у пухлинних клітинах хворих на РМЗ. Найбільшу кількість ЛФ-позитивних пухлин зафіксовано при інфільтративному протоковому РМЗ (91,1 %), тоді як при інфільтративному дольковому РМЗ лише у 72,0 % випадків ( $p < 0,05$ ), у новоутвореннях низького ступеня диференціювання (90,3 % випадків) порівняно з пухлинами помірного і високого ступеня диференціювання (79,0% і 69,0% відповідно;  $p < 0,05$ ) та у пухлинах базального молекулярного підтипу (97,1% випадків), ніж люмінального А та Б підтипів (67,9 % та 82,9 % випадків відповідно;  $p < 0,05$ ). Середній рівень експресії ЛФ (100-200 балів) виявлено у пухлинах високого та помірного ступеня

диференціювання, а також при люмінальному А підтипі РМЗ, тоді як в усіх досліджених випадках низькодиференційованого РМЗ базального молекулярного підтипу визначено високий рівень експресії ЛФ ( $>200$ ).

4. Виявлено достовірний прямий кореляційний зв'язок між вмістом ЛФ у сироватці крові, його експресією в пухлинних клітинах з такими молекулярно-біологічними характеристиками РМЗ як статус експресії РЕ і РП ( $r = -0,53$  та  $r = -0,61$  відповідно) та проліферативна активність клітин ( $r = 0,57$  та  $r = 0,49$  відповідно).

5. Визначено, що рівень експресії мікроРНК-214 у сироватці крові та пухлинних клітинах достовірно корелює з віком ( $r = -0,57$  і  $r = -0,44$  відповідно;  $p < 0,05$ ) та менструальною функцією ( $r = -0,56$  та  $r = -0,49$  відповідно;  $p < 0,05$ ) хворих на РМЗ, а також гістологічним типом ( $r = -0,50$  та  $r = -0,57$  відповідно;  $p < 0,05$ ), ступенем диференціювання ( $r = 0,67$  та  $r = 0,59$  відповідно;  $p < 0,05$ ) та молекулярним підтипом пухлин ( $r = -0,58$  та  $r = -0,61$  відповідно;  $p < 0,05$ ).

6. Загальна 5-річна виживаність хворих на РМЗ є достовірно меншою у пацієнтів за наявності експресії ЛФ, відсутності експресії РЕ і РП, високому проліферативному потенціалі пухлинних клітин.

7. Обґрунтовано можливість використання показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах для поглибленої характеристики пухлинного процесу та прогнозування агресивності перебігу РМЗ.

### **ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ**

1. Для оцінки агресивності перебігу РМЗ необхідним етапом комплексного обстеження хворих поряд із з'ясуванням гістологічного типу і молекулярного підтипу пухлин є визначення експресії ЛФ та мікроРНК-214 у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих.

2. Визначення показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах може бути включено в алгоритм дослідження біопсійного та операційного матеріалу хворих для більш детальної характеристики пухлинного процесу, визначення ступеня злоякісності РМЗ та планування персоналізованого лікування.

### **СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Chekhun V.F., Lukianova N.Yu., Polishchuk L.Z., Nalieskina L.A., Zadvornyi T.V., Storchai D.M., Todor I.N., Sobchenko S.O., Demash D.V., Yalovenko T.M., Borikun T.V., Lozovska Yu.V., Vitruk Yu.V., Chepurnatyi M.V., Pikul M.V., Stakhovsky O.E., Voilenko O.A., Stakhovsky E.O./ Editors: Hiroto S. Watanabe/. The role of lactoferrin expression in initiation and progression of most common hormone-dependent cancers/ R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology & Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine, and others/. Horizons in Cancer Research, 2017, Volume 66, Chapter 3.

- Р. 51-85. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, аналіз літературних джерел за темою дослідження, участь у написанні та оформленні розділу монографії).*
2. Chekhun V.F., Zalutskii I.V., Naleskina L.A., Lukianova N.Yu., Yalovenko T.M., Borikun T.V., Sobchenko S.O., Semak I.V., Lukashevich V.S. Modifying effects of lactoferrin in vitro on molecular phenotype of human breast cancer cells with varying degrees of malignancy and sensitivity of cytostatics // *Experimental Oncology*. – 2015. – V. 37, N 3. – P. 181-186. *(Дисертантом проведено підбір та аналіз літературних джерел за темою дослідження, узагальнення результатів, написання статті).*
  3. 4. Naleskina L.A., Lukianova N.Y., Sobchenko S.O., Storchai D.M., Chekhun V.F. Lactoferrin expression in breast cancer in relation to biologic properties of tumors and clinical features of disease // *Exp. Oncology*. – 2016. – Vol. 38, N 3. – P. 181-186. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, участь у підборі та аналізі літературних джерел за темою дослідження, участь у проведенні статистичних досліджень, узагальнення результатів, написання статті).*
  4. Лозовская Ю.В., Лукьянова Н.Ю., Задворный Т.В., Собченко С.А., Чехун В.Ф. Прогностические сывороточные биомаркеры рака молочной железы: лактоферрин, лактатдегидрогеназа и С-реактивный протеин // *Онкологический журнал (Беларусь)*.-2016.-Т.10, №4(40).- С. 33-41. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, участь у проведенні статистичних досліджень, узагальнення результатів, написання статті).*
  5. Тимовська Ю.О., Анікусько М.Ф., Собченко С.О. Відносне значення окремих факторів ризику у виникненні раку молочної залози у жінок різного вікового періоду // *Онкологія*. — 2013. — Т. 15, № 3. — С. 219-223. *(Дисертантом проведено анкетування пацієнток, підбір та аналіз літературних джерел за темою дослідження, участь у проведенні статистичних досліджень, узагальнення результатів, написання статті).*
  6. Ключов А.Н., Анікусько Н.Ф., Любота І.І., Савчук С.А., Катеринич А.А., Нейман А.М., Малець М.С., Собченко С.А., Долинський Ф.С. Интраоперационная цитологическая оценка наличия метастазов рака молочной железы в сторожевых лимфатических узлах // *Архів клінічної та експериментальної медицини*. - 2013. - Т.22, №1. - С. 32-43. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, узагальнення результатів обстеження хворих, написання статті).*
  7. Патент України на корисну модель. Спосіб визначення базального молекулярного підтипу пухлин у хворих на рак молочної залози / Лук'янова Н.Ю, Чехун В.Ф., Собченко С.О., Базась В.М., Ключов О.М., Чехун С.В., Демаш Д.В., Яловенко Т.М., Борікун Т.В. // Патент України на корисну модель № 111915. Дата публікації 2016/11/25. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, підбір і аналіз літературних джерел за темою дослідження, узагальнення отриманих результатів, оформлення патенту).*

8. Патент України на корисну модель. Спосіб прогнозування клінічного перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози / Чехун В.Ф., Налескіна Л.А., Сторчай Д.М., Собченко С.О., Шепеленко І.В., Кунська Л.М. Спосіб прогнозування клінічного перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози // Патент України на корисну модель 127149, № u201710879; опубл. 25.07.2018. - Бюл. № 14. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, підбір і аналіз літературних джерел за темою дослідження, узагальнення отриманих результатів, оформлення патенту).*
9. Спосіб персоналізованого прогнозу агресивності перебігу раку молочної залози / Лук'янова Н.Ю., Налескіна Л.А., Сторчай Д.М., Собченко С.О., Ключов О.М., Чехун В.Ф. // Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 354-2018. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, підбір і аналіз літературних джерел за темою дослідження, узагальнення отриманих результатів, оформлення інформаційного листа).*
10. Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, І.В. Шепеленко, Т.В. Борікун, С.В. Чехун, О.М. Ключов, С.О. Собченко // Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 191-2016. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, підбір і аналіз літературних джерел за темою дослідження, узагальнення отриманих результатів, оформлення інформаційного листа).*
11. Металовмісні білки як маркери моніторингу перебігу та ефективності хіміотерапевтичного лікування хворих на рак молочної залози / Чехун В.Ф., Лук'янова Н.Ю., Ключов О.М., Собченко С.О., Чехун С.В., Павлова А.О., Яловенко Т.М., Смоланка І.І. // Методичні рекомендації. - К., 2016. – 27 с. *(Дисертантом проведено аналіз даних історій хвороб, підбір і аналіз літературних джерел за темою дослідження, узагальнення отриманих результатів, оформлення методичних рекомендацій).*
12. Чехун В.Ф., Лук'янова Н.Ю., Поліщук Л.З., Задворний Т.В., Собченко С.О., Вітрук Ю.В., Чепурнатий М.В., Стаховський О.Е., Войленко О.А., Стаховський Е.О. / Дослідження експресії лактоферину в доброякісних і злоякісних пухлинах молочної та передміхурової залоз // Наук.-практ. конф. “Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин”: тези доп., Яремче, 15-16 жовтня 2015 р. - Онкологія. - 2015. - Т.17, №3. - С. 199.
13. Лук'янова Н.Ю., Собченко С.О., Чехун В.Ф. Дослідження рівня лактоферину у сироватці крові хворих на рак молочної залози // XIII з'їзд онкологів та радіологів України: матеріали з'їзду, м. Київ. 26-28 травня 2016 р. – К., 2016. – С. 203.
14. Налескіна Л.А. Лук'янова Н.Ю., Собченко С.О. Оцінка значення експресії лактоферину як показника біологічної активності раку молочної залози // XIII з'їзд онкологів та радіологів України: матеріали з'їзду, 26–28 травня 2016 р., м. Київ. – Укр. Радіол. Журн. – 2016. – Спец. вип. 1. - С. 202.

- 15.15. Лукьянова Н.Ю., Полищук Л.З., Задворний Т.В., Собченко С.А., Чепурнатый М.В., Стаховский А.Э., Витрук Ю.В., Войленко О.А., Стаховский Э.А., Чехун В.Ф. / Особенности экспрессии лактоферрина в доброкачественных и злокачественных опухолях молочной и предстательной железы // IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии, 15-17 июня 2016 г., Минск. - Евразийский онкологический журнал. - Т. 2, No 4. - С. 306.

## АНОТАЦІЯ

**Собченко С.О. Клініко-патологічне та молекулярно-біологічне значення лактоферину при раку молочної залози. – Рукопис.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук зі спеціальності 14.01.07 – онкологія. – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2021.

Дисертація присвячена актуальній проблемі онкології – дослідженню показників ЛФ в системі *in vitro* і *ex vivo* на клінічному матеріалі та обґрунтуванню його клініко-патологічного та молекулярно-біологічного значення при РМЗ. В експериментальній системі *in vitro* найбільші показники експресії ЛФ детектовано у клітинах високого ступеня злоякісності ліній MDA-MB-231 та MDA-MB-468 ( $285,0 \pm 2,1$  і  $251,0 \pm 2,3$  балів відповідно), порівняно з такими у клітинах низького ступеня злоякісності ліній T47D та MCF-7 ( $92,0 \pm 1,9$  та  $70,0 \pm 1,6$  балів відповідно). *Ex vivo* на клінічному матеріалі високий рівень сироваткового ЛФ ідентифіковано у жінок похилого віку, що знаходились у стані менопаузи, з інфільтративним протоковим РМЗ ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,05$ ), низького ступеня диференціювання ( $r = -0,54$ ;  $p < 0,05$ ) та базального молекулярного підтипу ( $r = -0,61$ ;  $p < 0,05$ ). Найбільшу кількість ЛФ-позитивних пухлин зафіксовано при інфільтративному протоковому РМЗ (91,1 %), у новоутвореннях низького ступеня диференціювання (90,3 %) та у пухлинах базального молекулярного підтипу (97,1% випадків) ( $p < 0,05$ ). Встановлено зв'язок між вмістом ЛФ у сироватці крові та його експресією в пухлинних клітинах з такими молекулярно-біологічними характеристиками РМЗ як статус експресії РЕ і РП ( $r = -0,53$  та  $r = -0,61$  відповідно) та проліферативна активність клітин ( $r = 0,57$  та  $r = 0,49$  відповідно). Доведено, що показники експресії циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 корелюють з віком та станом репродуктивної функції хворих ( $p < 0,05$ ), а також гістологічним типом ( $p < 0,05$ ), ступенем диференціювання та молекулярним підтипом пухлин ( $p < 0,05$ ). Загальна 5-річна виживаність хворих на РМЗ є достовірно меншою за наявності експресії ЛФ, відсутності експресії РЕ і РП та високому проліферативному потенціалі пухлинних клітин. Обґрунтовано можливість використання показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах для поглибленої характеристики пухлинного процесу та прогнозування агресивності перебігу РМЗ.

**Ключові слова:** рак молочної залози, лактоферин, мікроРНК-214, клініко-патологічні та молекулярно-біологічні особливості, прогноз перебігу.

## АННОТАЦИЯ

**Собченко С.А. Клинико-патологическое и молекулярно-биологическое значение лактоферина при раке молочной железы. – Рукопись.**

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.07 – онкология. – Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины, Киев, 2018.

Диссертация посвящена актуальной проблеме онкологии – исследованию показателей ЛФ в системе *in vitro* и *ex vivo* на клиническом материале и обоснованию его клинико-патологического и молекулярно-биологического значения при РМЖ.

В экспериментальной системе *in vitro* установлена гетерогенность экспрессии ЛФ в клетках линий РМЖ человека. Наибольшие показатели экспрессии ЛФ детектировались в клетках высокой степени злокачественности линий MDA-MB-231 и MDA-MB-468 ( $285,0 \pm 2,1$  и  $251,0 \pm 2,3$  баллов соответственно). Достоверно меньшую экспрессию ЛФ установлено в клетках обеих исследованных линий РМЖ низкой степени злокачественности T47D та MCF-7 ( $92,0 \pm 1,9$  та  $70,0 \pm 1,6$  баллов соответственно). Установлено, что экспрессия ЛФ в линиях РМЖ разной степени злокачественности коррелирует с пролиферативной и инвазивной активностью клеток ( $r = 0,50$  та  $r = 0,39$   $p < 0,05$  відповідно), адгезивными свойствами клеток ( $r = -0,46$ ;  $p < 0,05$ ), а также с экспрессией РЭ ( $r = -0,57$ ,  $p < 0,05$ ), РП ( $r = -0,49$ ;  $p < 0,05$ ). *Ex vivo* на клиническом материале установлено, что уровень ЛФ в сыворотке крови больных РМЖ **достоверно превышает максимальные референтные значения в 57,6% исследованных случаев ( $p < 0,05$ )**. Высокие показатели сывороточного ЛФ чаще идентифицировали у женщин пожилого возраста (старше 60 лет), которые находились в состоянии менопаузы, у которых обнаруживался инфильтрирующий протоковый РМЖ ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,05$ ), низкой степени дифференцировки ( $r = -0,54$ ;  $p < 0,05$ ) и базального молекулярного подтипа ( $r = -0,61$ ;  $p < 0,05$ ). Наибольшее количество ЛФ-положительных опухолей зафиксированно при инфильтрирующем протоковом РМЖ (91,1 %), в новообразованиях низкой степени дифференцировки (90,3 %), а также в опухолях базального молекулярного подтипа (97,1% випадків) ( $p < 0,05$ ). Следует отметить, что во всех исследованных случаях низкодифференцированного РМЖ базального молекулярного подтипа определялся высокий уровень экспрессии ЛФ ( $> 200$  баллов), в то время как в опухолях высокой и умеренной степени дифференцировки люминального А молекулярного подтипа детектировали средний уровень экспрессии ЛФ (100-200 баллов). Установлена связь между содержанием ЛФ в сыворотке крови и его экспрессией в опухолевых клетках с такими молекулярно-биологическими характеристиками РМЖ как статус экспрессии РЭ и РП ( $r = -0,53$  и  $r = -0,61$  соответственно) и пролиферативная активность клеток ( $r = 0,57$  и  $r = 0,49$  соответственно). Доказано, что показатели экспрессии циркулирующей и опухоль-ассоциированной микроРНК-214 коррелируют с возрастом и состоянием репродуктивной функции больных ( $p < 0,05$ ), а также с гистологическим типом опухолей ( $p < 0,05$ ), их степенью

дифференцировки и молекулярным подтипом ( $p < 0,05$ ). Общая 5-летняя выживаемость больных РМЖ значительно хуже у пациентов с наиболее агрессивным базальным молекулярным подтипом новообразований, опухолевые клетки которых экспрессируют ЛФ, имеют негативный рецепторный статус и высокий пролиферативный потенциал.

Обосновано возможность использования показателей ЛФ в сыворотке крови и опухолевых клетках для углубленной характеристики опухолевого процесса та прогнозирования агрессивности течения РМЖ.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, лактоферрин, микроРНК-214, клиничко-патологические и молекулярно-биологические особенности, прогноз течения.

## SUMMARY

**Sobchenko S.O. Clinical, pathological and molecular-biological significance of lactoferrin in breast cancer. - Manuscript.**

Thesis for the degree of candidate degree of medical sciences in specialty 14.01.07 - oncology. – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2021.

Thesis is devoted to the actual problem of oncology - the study of LF *in vitro* system and *ex vivo* on clinical material and substantiation of its clinical-pathological and molecular-biological significance in breast cancer. In the *in vitro* experimental system, the highest expression rates of LF were detected in cells with a high degree of malignancy of the lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468 ( $285.0 \pm 2.1$  and  $251.0 \pm 2.3$  points, respectively), compared with the low degree of malignancy cells T47D and MCF-7 ( $92.0 \pm 1.9$  and  $70.0 \pm 1.6$ , respectively). *Ex vivo* on clinical material, a high level of serum LF was identified in elderly women who were in menopause, with infiltrative ductal breast cancer ( $r = 0.49$ ;  $p < 0.05$ ), a low degree of differentiation ( $r = -0.54$ ;  $p < 0.05$ ) and basal molecular subtype ( $r = -0.61$ ;  $p < 0.05$ ). The largest number of LF-positive tumors was recorded in infiltrative ductal breast cancer (91.1%), in tumors of low degree of differentiation (90.3%) and in tumors of the basal molecular subtype (97.1% of cases) ( $p < 0.05$ ). A connection was found between the content of LF in serum and its expression in tumor cells with such molecular and biological characteristics of breast cancer as the expression status of PE and RP ( $r = -0.53$  and  $r = -0.61$ , respectively) and proliferative activity of cells ( $r = 0.57$  and  $r = 0.49$ , respectively). It is proved that the expression of circulating and tumor miRNA-214 correlates with age and state of reproductive function of patients ( $p < 0.05$ ), as well as histological type ( $p < 0.05$ ), the degree of differentiation and molecular subtype of tumors ( $p < 0, 05$ ). The overall 5-year survival of patients with breast cancer is significantly lower in the presence of LF expression, no expression of PE and RP and high proliferative potential of tumor cells. The possibility of using LF indicators in blood serum and tumor cells was grounded for in-depth characterization of the tumor process and prediction of the aggressiveness of the breast cancer.

**Key words:** breast cancer, lactoferrin, miRNA-214, clinical-pathological and molecular-biological features, prognosis.

### **ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

РМЗ - рак молочної залози

ЛФ - лактоферин

РЕ - рецептори естрогенів

РП - рецептори прогестерону

ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція