

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
Національна академія наук України

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

СОБЧЕНКО СЕРГІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 616 – 006.6: 576.3: 616-037

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

14.01.07 – онкологія

222 – медицина

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ С.О. Собченко

Науковий керівник Чехун Василь Федорович, академік НАН України,
доктор медичних наук, професор

Київ – 2021

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.

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 ремодуляцією протеїнів-регуляторів обміну заліза, які відіграють важливу роль у здійсненні процесів диференціювання, інвазії, проліферації, міграції та апоптозу. Дана дисертаційна робота присвячена дослідженню показників ЛФ в системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі та обґрунтуванню його клініко-патологічного та молекулярно-біологічного значення при РМЗ.

Експериментальними дослідженнями в системі *in vitro* встановлено зв'язок експресії ЛФ із молекулярним фенотипом та ступенем злоякісності клітин 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 ($r = -0,46$; $p < 0,05$).

На клінічному матеріалі доведено та підтверджено власні

експериментальні дані відносно зв'язку показників ЛФ із ступенем злоякісності РМЗ. Найвищі показники вмісту ЛФ у сироватці крові ідентифіковано 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 $r = -0,61$; $p < 0,05$).

При аналізі показників експресії ЛФ у пухлинних клітинах високий, середній та низький рівень експресії ЛФ констатовано у цитоплазмі клітин 40%, 27% та 12% хворих, відповідно, серед всієї когорти хворих на РМЗ. Достовірно меншу кількість позитивних пухлин за експресією досліджуваного маркера виявлено у хворих зі збереженою менструальною функцією (64% хворих), ніж у хворих, що знаходились у менопаузі (82% хворих).

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).

З метою виявлення епігенетичних порушень регуляції експресії ЛФ було проведено вивчення особливостей експресії мікроРНК-214 у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ. 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 пацієток 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).

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).

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; $p < 0,05$).

Таким чином, 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.

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 – PE, PP і Ki-67.

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, $p < 0,05$).

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.

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 ЕР (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 ($p < 0,05$).

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 (РЕ⁻, РП⁻) 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 РЕ і РП, а також проліферативною активністю новоутворень, було проаналізовано загальну виживаність хворих на РМЗ з урахуванням показників експресії зазначених маркерів. Достовірне зниження показників 5-річної загальної виживаності на 16,9%, встановлено у хворих, пухлинні клітини яких експресують ЛФ, мають негативний статус експресії РЕ, РП та високий проліферативний потенціал (експресія Ki-67 у понад 50% пухлинних клітин), ніж у хворих із молекулярним профілем пухлини ЛФ⁺, РЕ⁻, РП⁻ 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 (РЕ⁻, РП⁻) 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.

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

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.

One of the priorities of basic oncology is an in-depth study of the biology of tumor cells for finding additional diagnostic and prognostic markers of breast cancer. It is proved that the development and progression of breast cancer is accompanied by remodulation of proteins-regulators of iron metabolism, which play an important role in the processes of differentiation, invasion, proliferation, migration and apoptosis. This thesis is devoted to the study of LF parameters in the *in vitro* and *ex vivo* system on clinical material and justification of its clinical-pathological and molecular-biological significance in breast cancer.

Experimental studies *in vitro* have shown a connection between LF expression and the molecular phenotype and the degree of malignancy of breast cells. The highest indicators of LF expression were found in cells with a high degree of malignancy of the lines MDA-MB-231 and MDA-MB-468 (285.0 ± 2.1 and 251.0 ± 2.3 points, accordingly), compared with those in low malignancy lines T47D and MCF-7 (92.0 ± 1.9 and 70.0 ± 1.6 points, accordingly). It was found that the expression of LF in cells of breast cancer lines of different degrees of malignancy directly correlates with the proliferative and invasive activity of cells ($r = 0.50$ and $r = 0.39$ $p < 0.05$, accordingly), and also inversely correlates with the expression of PE - 0.57 , $p < 0.05$), RP ($r = -0.49$; $p < 0.05$) and adhesive properties of cells ($r = -0.46$; $p < 0.05$).

The clinical material proved and confirmed our own experimental data of the

connection of LF indicators with the degree of malignancy of breast cancer. The highest levels of LF in the serum were identified in elderly women (over 60 years) who were in menopause, with infiltrative ductal breast cancer ($r = 0.49$; $p < 0.05$), low degree of differentiation, 54; $p < 0.05$) and basal molecular subtype $r = -0.61$; $p < 0.05$).

In the analysis of LF expression in tumor cells, high, medium and low levels of LF expression were found in the cytoplasm of cells of 40%, 27% and 12% of patients, accordingly, among the entire cohort of patients with breast cancer. Significantly fewer positive tumors with the expression of the studied marker were found in patients with preserved menstrual function (64% of patients) compared with the menopausal patients (82% of patients).

The largest number of LF-positive tumors was recorded in infiltrative ductal breast cancer (91.1%), while in infiltrative lobular breast cancer only in 72.0% of cases ($p < 0.05$), in tumors with a low degree of differentiation (90.3% of cases).) compared with tumors of moderate and high degree of differentiation (79.0% and 69.0%, accordingly; $p < 0.05$) and in tumors of the basal molecular subtype (97.1% of cases) than luminal A and B subtypes (67, 9% and 82.9% of cases, accordingly, $p < 0.05$). The average level of LF expression (100-200 points) was found in tumors of high and moderate degree of differentiation, as well as in luminal A subtype of breast cancer, while in all studied cases of low-grade breast cancer of the basal molecular subtype high level of LF expression (> 200).

In order to detect epigenetic disorders of regulation of LF expression, the study of the peculiarities of miRNA-214 expression in the serum and tumor tissue of patients with breast cancer was studied. It was found that the expression of miRNA-214 in tumor tissue directly correlates with its level in the serum of patients with breast cancer ($r = 0.65$). The lowest expression of miRNA-214 was identified in the serum and tumor tissue of patients older than 60 years (3.6 ± 0.4 and 3.4 ± 0.3 USD, accordingly) who were in the menopausal state (6.5 ± 0.4 and 3.1 ± 0.3 USD, accordingly).

It was found that the expression levels of circulating and tumor-associated miRNA-214 were significantly higher in patients with a high degree of differentiation of breast cancer (7.2 ± 0.4 and 8.2 ± 0.3 USD) than in patients with moderate tumors (5.6 ± 0.3 and 6.4 ± 0.1 USD) and low degree of differentiation (3.4 ± 0.2 and 4.2 ± 0.3 USD), in patients with luminal A subtype of breast cancer (7.5 ± 0.5 and 8.5 ± 0.5 USD) compared with patients with luminal B (4.6 ± 0.3 and 6.1 ± 0.4 USD) and basal tumor subtypes (2.9 ± 0.4 and 3.4 ± 0.2 USD, accordingly).

It was determined that the level of miRNA-214 expression in blood serum and tumor cells significantly correlated with age ($r = -0.57$ and $r = -0.44$, accordingly; $p < 0.05$) and menstrual function ($r = -0.56$ and $r = -0.49$, accordingly; $p < 0.05$) of patients with breast cancer, as well as histological type ($r = -0.50$ and $r = -0.57$, accordingly; $p < 0.05$), the degree of differentiation = 0.67 and $r = 0.59$, accordingly; $p < 0.05$) and molecular subtype of tumors ($r = -0.58$ and $r = -0.61$, accordingly; $p < 0.05$).

Thus, the high level of LF expression in breast cancer cells with a low degree of differentiation of the basal molecular subtype is a consequence of impaired expression of circulating and tumor-associated miRNA-214. The obtained data indicate the key role of miRNA-214 in the mechanisms of LF expression disorders in breast cancer and confirm its participation in the formation of the degree of malignancy of the tumor.

Considering the data obtained on the connection between LF in serum and the expression of LF in tumor tissue with the molecular subtype of breast cancer, the next step was to clarify the patterns between the presence of this protein in clinical material and some key markers that determine the molecular subtype tumors - PE, RP and Ki-67. The highest level of LF was found in the serum of patients with breast cancer with a negative receptor status of steroid hormones of tumors compared with patients whose tumors express both test receptors (PE and RP) (2254.3 ± 82.6 vs. $1156.6 \pm 78, 0$ ng / ml, $p < 0.05$).

With the presence of expression of one of the steroid hormone receptors, the

content of LF in the serum of patients with breast cancer was in the range from 1630 to 2280 ng / ml. In patients with breast cancer with high and medium proliferative activity of tumor cells, which was determined by the level of expression of Ki-67, the content of serum LF was 1.6 ($p < 0.05$) and 1.3 ($p < 0.05$) times higher compared with patients with tumors with low proliferative potential.

We found a similar pattern in the analysis of the connection between LF expression in tumor cells with receptor status and proliferative activity of breast cancer. The largest number of LF-negative tumors was found in patients with breast cancer with the presence in tumor cells of the expression of both steroid hormone receptors (45.0% of cases) and in the presence of EP expression (56.3% of cases) ($p < 0.05$). It was found that LF expression is more typical for breast cancer with high or medium levels of Ki-67 expression in tumor cells ($p < 0.05$).

When comparing the levels of LF expression in tumor cells with receptor status and proliferative activity of breast cancer, it was found that a high level of LF expression (> 200 points) is determined only in tumors with negative receptor status (PE-, RP-) and high Ki-67 expression. Statistical analysis revealed that the increase in LF in serum and tumor cells directly correlates with the proliferative activity of breast cancer ($r = 0.57$ and $r = 0.49$, accordingly) and inversely correlates with the expression status of steroid hormone receptors. 0.53 and $r = -0.61$, accordingly).

Considering the obtained data on the connection of LF expression with the expression status of PE and RP, as well as the proliferative activity of tumors, the overall survival of patients with breast cancer was analyzed considering the expression of these markers. A significant reduction in 5-year overall survival by 16.9% was found in patients whose tumor cells express LF, have a negative status of expression of PE, RP and high proliferative potential (expression of Ki-67 in more than 50% of tumor cells) than in patients with molecular tumor profile LF +, PE-, RP- and low proliferative potential (Ki-67 expression in less than 50% of tumor cells). In contrast, it was found that in patients with a positive expression status of steroid hormone receptors in the presence of LF-positive tumors, there is only a tendency to

decrease the 5-year overall survival of patients depending on their proliferative potential.

Thus, we established the connection between LF and the molecular profile of breast cancer. The highest level of LF was registered in the serum and tumor cells of patients with receptor-negative (PE-, RP-) breast cancer, which has high proliferative activity. It was found that the lowest 5-year overall survival is observed among patients with breast cancer in the presence of LF expression in receptor-negative tumor cells on the background of high Ki-67 expression. The results indicate that LF can be used as an objective criterion for determining the aggressiveness of the basal subtype of breast cancer, which will improve the treatment results of this group of patients.

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

Список публікацій здобувача

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. - P. 51-85..
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 vaying degrees of malignamcy and sensitivity of cytostatics // Experimental Oncology. – 2015. – V. 37, N 3. – P. 181-186.
3. 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.
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.
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.
6. Ключов А.Н., Аникусько Н.Ф., Любота И.И., Савчук С.А., Катеринич А.А., Нейман А.М., Малец М.С., Собченко С.А., Долинский 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.

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.
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.
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.
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.
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.
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. 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. - Евразийський онкологический журнал. - Т. 2, No 4. - С. 306.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1	26
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	26
1.1. РМЗ як актуальна медико-біологічна проблема сьогодення	26
1.2. Молекулярно-генетична класифікація як відображення клінічної гетерогенності РМЗ.....	29
1.3. Перспективи застосування молекулярно-біологічних маркерів для оцінки агресивності перебігу РМЗ	34
1.4. Роль порушень метаболізму заліза у виникненні та прогресії РМЗ	38
1.5. Зміни показників лактоферину при пухлинному рості в молочній залозі.....	41
РОЗДІЛ 2	50
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	50
2.1. Об'єкти досліджень в системі <i>in vitro</i>	50
2.1.1. Клітинні лінії, умови культивування <i>in vitro</i>	50
2.1.2. Загальна клінічна характеристика хворих на РМЗ	53
2.2. Методи експериментального дослідження клітинних ліній РМЗ	59
2.2.1. Метод цитоморфологічного дослідження клітин РМЗ в експериментальній системі <i>in vitro</i>	59
2.2.2. Імуноцитохімічний метод дослідження клітин РМЗ <i>in vitro</i>	59
2.3. Методи дослідження клінічного матеріалу	61
2.3.1. Метод морфологічного дослідження видалених пухлин у хворих на РМЗ	61
2.3.2. Визначення вмісту ЛФ в сироватці крові хворих на РМЗ методом твердофазного імуноферментного аналізу	62
2.3.3. Дослідження експресії молекулярних маркерів у пухлинній тканині хворих на РМЗ за допомогою імуногістохімічного методу	63
2.3.4. Визначення експресії мікроРНК в пухлинній тканині та сироватці	

крові пацієнтів з РМЗ.....	65
2.4. Методи статистичної обробки одержаних результатів.....	67
РОЗДІЛ 3	68
ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ЛАКТОФЕРИНУ В КЛІТИНАХ ЛІНІЙ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ	68
3.1. Особливості росту та цитоморфологічна характеристика клітинних ліній РМЗ людини різного ступеня злоякісності в системі <i>in vitro</i>	68
3.2. Зв'язок експресії лактоферину з особливостями молекулярного профілю клітин РМЗ різного ступеня злоякісності в системі <i>in vitro</i>	73
РОЗДІЛ 4	76
ЗВ'ЯЗОК ПОКАЗНИКІВ ЛАКТОФЕРИНУ З КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ	76
4.1. Дослідження показників ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ.....	76
4.2. Особливості експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих на РМЗ	81
РОЗДІЛ 5	90
ЗВ'ЯЗОК ЛАКТОФЕРИНУ З МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ НОВОУТВОРЕНЬ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ.....	90
5.1. Особливості експресії пухлинної та циркулюючої мікроРНК-214, що бере участь у регуляції експресії ЛФ, у хворих на РМЗ	90
5.2. Залежність показників експресії ЛФ від статусу експресії деяких молекулярно-біологічних маркерів клітин РМЗ	95
РОЗДІЛ 6	103
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	103
ВИСНОВКИ	114
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	116
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	117

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

Гп – гепсидин

ЛФ – лактоферин

МСА – муциноподібний асоційований антиген

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція

РЛВ – регіонарні лімфатичні вузли

РЕ – рецептори естрогенів

РЕА – раковий ембріональний антиген

РМЗ – рак молочної залози

РП – рецептори прогестерону

ТФ – трансферин

ФР – феритин

ФРГ – фактор росту гепатоцитів

ММР – металопротеази

ВСТУП

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 [1-6]. 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 [7-10].

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 [11-14]. 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 [15-18].

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 центру [19,20].

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 [21-24]. 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 [25]. 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 [26, 27]. Іншими дослідниками встановлено антиканцерогенну дію рекомбінантного ЛФ людини на пухлинні клітини в системі *in vitro* [28-30].

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 змолекулярно-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 ЛФу 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-MB468 ($285,0 \pm 2,1$ 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 PE і PP, мають високі адгезивні властивості і низьку інвазивну активність.

Розширено наукові дані щодо асоціації порушень метаболізму залізоzv'язуючих білків в пухлинних клітинах та організмі хворих зі ступенем злоякісності РМЗ. Найвищий рівень ЛФ у сироватці крові та найбільшу кількість пухлині з 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 PE та PP ($r = -0,53$ 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. РМЗ як актуальна медико-біологічна проблема сьогодення

Згідно висновків ВООЗ, виникнення й розвиток злоякісних новоутворень жіночої репродуктивної сфери значною мірою обумовлені особливостями довкілля. Про це свідчить великий діапазон коливань показників захворюваності в різних країнах світу, особливо виражений при РМЗ, раку тіла та шийки матки. Однією з найхарактерніших особливостей поширення злоякісних пухлин серед жінок економічно розвинених країн є значне підвищення частоти РМЗ, який займає провідне місце в структурі онкологічної захворюваності та смертності [31, 32]. Зокрема, сьогодні РМЗ входить в п'ятірку найбільш поширених в світі онкологічних захворювань і лідирує серед причин смерті жінок у віці до 50 років. У 25% випадків РМЗ діагностується в репродуктивному віці. Щорічно в світі реєструється більше 1 млн. нових випадків РМЗ, а найвища захворюваність фіксується в США, Канаді, Франції, Ізраїлі, Швейцарії, Іспанії, Фінляндії, прибалтійських країнах, Австралії та на Гавайських островах. Низькі показники захворюваності на РМЗ відзначаються в країнах Азії, Африки, Південної Америки [33,34].

Згідно з даними Національного канцер-реєстру України, у 2018 р. показник захворюваності на РМЗ в Україні за світовим стандартом становив 45,3 при абсолютному показнику загальної кількості захворювань — 14 872 випадки [1]. За останні 10 років смертність від РМЗ серед жінок зросла більше ніж у 2,5 рази і зайняла 1-ше місце [2]. Стандартизований показник смертності в Україні в 2018 р. дорівнював 14,8 при загальній кількості померлих 5679 осіб [35].

Відзначається, що захворюваність на РМЗ має 2 піки: 1-й припадає на вікову групу 40–45 років (пременопаузальний РМЗ), 2-й — після 50–55 років

(постменопаузальний РМЗ). Вважають [4], що ризик захворіти на РМЗ після 65 років у 150 разів перевищує такий у осіб молодших 30 років. В Україні захворюваність на РМЗ жінок у віці 40–45 років становить 61,4, а у віці 50–55 років — 120,0 осіб на 100 тис. населення. Смертність у цих вікових групах хворих дорівнює 17,2 та 49,7 осіб на 100 тис.населення, відповідно. Останнє можна пояснити тим, що жінки похилого віку, хворі на РМЗ, звертаються у спеціалізовані лікувальні установи, коли хвороба має розповсюджений характер. Демографічні зміни у сучасному суспільстві, які проявляються «старінням» населення, підвищують актуальність проблеми діагностики і лікування РМЗ у хворих похилого віку [36].

Загалом, показники захворюваності на РМЗ в світі протягом останніх 30 років збільшилися, що пов'язано з абсолютним і відносним зростанням захворюваності. Абсолютний ріст обумовлений різними соціально-економічними причинами, а відносне зростання загальної кількості вперше виявленого РМЗ пов'язане з поліпшенням ранньої (скринінгової) діагностики патології [37, 38].

На розвиток РМЗ впливають численні фактори: стан репродуктивної системи, генетичні, конституційні, аліментарні, соціально-економічні, патологічні процеси, пов'язані з порушенням функції гіпоталамо-гіпофізарної системи, супутні захворювання. До останніх можуть належати захворювання щитовидної залози з гіпотиреозом, раннє ожиріння з появою менструації до 12 років, доброякісні гіперпластичні процеси молочних залоз. Відносний ризик захворіти на РМЗ для жінок, у яких менструації настали раніше 12 років, в 2 рази вище, ніж для тих, у кого місячні з'явилися в 16 років і старше. Крім того, виявлено, що ризик виникнення РМЗ при настанні менопаузи після 55 років в 2-2,5 рази вище, ніж при менопаузі до 45 років. У той же час відбувається зниження ризику виникнення РМЗ на 47% у жінок з видаленими з різних причин яєчниками у віці до 40 років в порівнянні з контингентом жінок з природною менопаузою в 45-54 роки. Встановлено, що жінки, які пізно почали

статеве життя і не народжували мають підвищений ризик захворюваності на РМЗ, в той час як зі збільшенням ж числа пологів цей показник послідовно зменшується.

Фактор спадковості в розвитку РМЗ становить 5-10% випадків від усіх карцином грудей, і більшість з них обумовлений наявністю аутосомно-домінантної зародкової мутації генів *BRCA1* і *BRCA2*. Імовірність мутації *BRCA* висока серед жінок з РМЗ у віці до 45 років, у яких у сімейному анамнезі відзначається захворюваність на РМЗ до 40 років. За даними N. Loman et al. [9], у жінок з сімейною історією раку грудей або яєчників ризик мутації генів *BRCA1* або *BRCA2* досягає 40% [33, 39-40].

В останнє десятиліття світовою онкологією досягнуті значні успіхи в лікуванні РМЗ. Основою успішного лікування є комплексний підхід – оптимальне поєднання хірургічного, хіміотерапевтичного та радіотерапевтичного етапів. Тактика лікування вибирається спільно клінічними онкологами, хірургами, радіотерапевтами. На вибір методу лікування впливає тип пухлини, її розмір, наявність метастазів, індивідуальні особливості кожного конкретного пацієнта [41].

До недавнього часу класичним підходом вважалося хірургічне видалення пухлини разом з усією молочною залозою і шляхами лімфовідтоку – регіонарними лімфовузлами (мастектомія) з подальшим можливим проведенням хіміотерапії або гормонотерапії. Однак сучасні підходи до хірургічного лікування значно змінилися.

Радіотерапія або променева терапія при РМЗ застосовується в основному в трьох випадках: для зменшення ймовірності розвитку рецидиву після висічення пухлини в молочній залозі і після видалення уражених лімфатичних вузлів; для симптоматичного (паліативного) лікування неоперабельних пухлин, у разі розвитку ускладнень – виразки, кровотечі; для паліативного лікування віддалених метастазів, якщо вони викликають важкі ускладнення – з боку головного або спинного мозку, а також виражений больовий синдром [42].

Проте, незважаючи на досягнення клінічної онкології, смертність від РМЗ все ж продовжує неухильно зростати у більшості країн світу, за винятком країн Західної Європи та Північної Америки, де смертність від цієї форми раку зменшується за рахунок впровадженого скринінгу та застосування системної терапії. Широке використання медикаментозних засобів спричинило дискусію щодо того, чи потрібно всіх без винятку хворих, у котрих вперше діагностовано РМЗ, лікувати з використанням широкого спектра найефективніших, але найагресивніших засобів хіміотерапії [36, 43].

Прогноз перебігу РМЗ залежить від стадії пухлинного процесу, швидкості його перебігу та віку хворих. У запущених стадіях тривалість життя складає 2-3 роки, при лікуванні локалізованої форми I-II стадії складає 90%, при локалізованій формі раку – 60%, результати лікування набагато гірші при наявності віддалених метастазів [44].

На жаль, результати лікування окремих пацієнтів не завжди є задовільними. У зв'язку з цим виникає необхідність пошуку надійних клініко-морфологічних прогностичних факторів для вибору тактики ведення пацієнтів. Важливе прогностичне значення, що робить вплив на загальну і безрецидивну виживаність, мають: розмір пухлини, морфологічні особливості, наявність метастазів в пахвових лімфатичних вузлах, характеристика молекулярно-біологічного профілю пухлини [45].

1.2. Молекулярно-генетична класифікація як відображення клінічної гетерогенності РМЗ

Біологічне явище внутрішньоклітинної гетерогенності, в основі якої лежить генетична нестабільність, є багаторівневим і вважається ключовим фактором, що визначає спрямованість пухлинного процесу як на початку його виникнення, так і в реалізації різних форм пухлинної прогресії, тобто агресивності перебігу захворювання [46].

Протягом багатьох років онкологи намагалися класифікувати пухлини молочної залози, прагнучи за фізичною подобою виявити загальні біологічні

механізми. Спроби згрупувати РМЗ навколо клініко-патологічних параметрів виявилися непереконливими. Moll в 1982 р вперше запропонував розділити всі карциноми на "люмінальні" і "базальні", в залежності від того, які цитокератини в них експресуються. У 1987 р Dairkee описав асоціацію між швидкими рецидивами РМЗ і експресією базальних цитокератинів. У 1998 р Malzahn і співавтори звернули увагу на те, що базальний РМЗ, як правило, естроген-негативний, низькодиференційований і характеризується несприятливим клінічним прогнозом. Застосування техніки мікрочіпування для тотального скринінгу транскрипційної активності геному пухлинної клітини дозволило на новому рівні підійти до розуміння причин фенотипової гетерогенності новоутворень молочної залози [47].

На сьогодні серед пухлин РМЗ виділяють 20 гістологічних типів, 8 молекулярно-генетичних та 6 геномних підтипів, які характеризуються специфічними молекулярними, біохімічними властивостями, різним клінічним перебігом та варіабельними безпосередніми і віддаленими результатами лікування [6]. Широке застосування у клінічній практиці набула молекулярно-генетична класифікація РМЗ. В її основу покладені результати досліджень, отримані у 2000 р *Perou et al.*, які використали кластерний аналіз 465 генів, що експресуються у хворих на РМЗ, визначили 5 різних молекулярних підтипів РМЗ, що відрізняються особливостями перебігу та прогнозу [48, 49].

Останні розділилися на дві підгрупи з позитивним статусом рецепторів естрогенів (РЕ), які формують люмінальний А і люмінальний Б підтипи, одну підгрупу з ампліфікацією гена HER/2-neu (HER/2-позитивна підгрупа), одну підгрупу базального типу РМЗ, що характеризується відсутністю експресії РЕ і другого рецептора епідермального фактора росту при відсутності ампліфікації відповідних кодуєчих генів. Ще одна підгрупа позначена як некласифікований РМЗ [50]. Це була перша молекулярно-генетична онкологічна класифікація, створена не на основі клініко-анатомічної та морфологічної гетерогенності пухлинних клітин, а на підставі ознакою їх молекулярно-генетичної

гетерогенності.

Наступні аналізи, проведені за допомогою геномних, транскриптомних і протеомних методів, виявили ще більшу молекулярну гетерогенність РМЗ [51]. Так, для люмінального підтипу РМЗ геномна і транскриптомна архітектура виявилася найбільш різноманітною – сьогодні в рамках одного люмінального підтипу налічують, як мінімум, 10 варіантів з різною комбінацією протоонкогенів. Кожен з численних підтипів РМЗ демонструє різний прогноз і різні терміни віддаленої виживаності [52].

Не менш гетерогенним виявився "тричі негативний" тип РМЗ. Цей базальний підтип може протікати з імунним компонентом (імунна інфільтрація виявляється у 15% хворих), експресувати рецептори андрогенів (15%), супроводжуватися активацією PI3K, втратою PTEN та/або TP53 і мутаціями гену BRCA1, що спостерігається у 20% хворих. Численні мутації в герміногенних генах є свідченням спадкового характеру захворювання [52].

Серед HER2-позитивних пухлин сьогодні виділяють ще два молекулярні підтипи. В одній підгрупі була виявлена висока експресія EGFR, HER, EGFR4, у другій підгрупі встановлена висока експресія кластера генів, характерних для люмінального типу РМЗ, в тому числі GATA3, BCL2 і ESR1. Крім цього, HER2 - позитивні пухлини мають високу частоту мутацій PIK3CA (39%) і більш низьку частоту мутацій PTEN. Інші можливі варіанти родини HER включають такі мутації як HER2 і HER3 [53, 54].

Проте, за останні 15 років традиційні класифікації РМЗ на основі гістопатологічних характеристик були реорганізовані у молекулярно-генетичну класифікацію. Водночас у зв'язку з труднощами здійснення повного аналізу експресії досліджених генів, у рутинній клінічній практиці з використовують спрощену модель молекулярно-генетичної класифікації РМЗ, а у 2011 р. на XII Міжнародній конференції, присвяченій РМЗ (St. Gallen), затверджено новий підхід до планування терапії пацієнток із РМЗ на підставі ідентифікації молекулярних підтипів цього захворювання [55].

Згідно консенсусу, на основі імуногістохімічного дослідження експресії РЕ та РП в клітинах пухлини, а також рецептора епідермального фактора росту 2-го типу (Her2 / neu, ErbB2), РМЗ можна класифікувати на 4 підтипи, які відрізняються між собою за прогнозом перебігу та відповіддю на медикаментозну терапію. Таким чином, геномна класифікація РМЗ замінена на клініко-патологічну, основою якої є імуногістохімічне визначення основних рецепторів пухлинних клітин. Прийнято вважати, що перекривання молекулярно-генетичної та клініко-патологічної класифікацій становить 75% [56, 57].

Згідно з Міжнародними рекомендаціями, на сьогодні виділено 4 біологічні підтипи РМЗ: люмінальний А, HER-2-позитивний та базальний (тричі негативний) (Табл. 1.1).[55,57].

Таблиця 1.1

Молекулярні підтипи раку молочної залози і ключові зміни в генотипі пухлини [57]

Молекулярний підтип	Експресія рецепторів	Частка підтипів	Зміни в генотипі
Люмінальний А	ER+ PR+ HER-2–	30-45%	Мутації в генах PIK3CA, MAP3K1, GATA3, FOXA1, виражена експресія генів ESR1, XBP1
Люмінальний В	ER+ PR+ HER-2+	14-18 %	Мутації в генах TP53, PIK3CA, ампліфікації цикліна D1, MDM2, делеція гена ATM
HER-2-позитивний	ER–PR–HER-2+	8-15 %	Мутації в генах TP53, PIK3CA, APOBEC, ампліфікації HER2, цикліна D1
Базальний (тричі негативний)	ER–PR–HER-2–	27-39 %	Мутації в гені TP53, делеції генів RB1, BRCA1, активація FOXM1

Найбільш сприятливим щодо прогнозу перебігу є люмінальний А молекулярний підтип новоутворень. Пухлини цього підтипу частіше за все діагностуються у похилому віці, характеризуються повільним ростом, низьким ризиком розвитку рецидивів та смертності від прогресування пухлинного процесу [17–19]. Дослідники з Каліфорнійського Національного канцер-реєстру

на клінічному матеріалі 61 тис. жінок із первинним інвазивним РМЗ показали, що 5-річна загальна виживаність при люмінальних HER-2– пухлинах становить 96%, а у хворих з HER-2-позитивними тричі негативними пухлинами –76%.

Люмінальний В підтип РМЗ відрізняється більш агресивним перебігом у зв'язку з високою проліферативною активністю пухлинних клітин, більш низькою експресією рецепторів стероїдних гормонів у новоутвореннях і наявністю експресії HER-2/neu (при HER-2/neu-позитивному підтипі). Ці характеристики зумовлюють більш високий метастатичний потенціал новоутворень молекулярного В підтипу та менш сприятливий (порівняно з люмінальним А підтипом) прогноз захворювання [20–22].

Гетерогенна група пухлин тричі негативного підтипу поєднує як несприятливий базальноподібний РМЗ, так і рідкісні, сприятливі варіанти пухлин (медулярний, слизовий, аденокістозний РМЗ). Базальноподібний рак відрізняється більш молодим віком маніфестації захворювання, високим ступенем злоякісності пухлини, високим індексом проліферації пухлинних клітин та асоціацією із сімейним і BRCA-мутованим РМЗ. Ці характеристики призводять до суттєвого підвищення ризику рецидивів у перші 3 роки та ризику смерті від прогресування пухлинного процесу у перші 5 років після лікування первинної пухлини [23, 24].

HER-2+ пухлини зустрічаються у 10–30% жінок, в основному маніфестують у молодому віці, характеризуються агресивністю і швидкою дисемінацією пухлинних клітин [25, 26]. До введення у рутинну практику герцептину прогноз у хворих із цим підтипом пухлин був несприятливим. Введення в ад'ювантні режими цього лікарського засобу (з 2006р.) дозволило знизити ризик прогресування до 50%, а ризик смерті — до 30% при ранньому РМЗ [58, 59].

В останні роки деякі дослідники пропонують візуалізацію та кількісні радіометричні підходи до прогнозування підтипів РМЗ за молекулярною класифікацією. Висловлюється думка, що всебічна інформація щодо

мікросередовища пухлини, у тому числі у динаміці її росту, отримана за допомогою мультимодульної системи візуалізації, яку вважають за доцільне називати радіоміткою, є кроком до успішної корекції терапії з урахуванням численних особливостей новоутворення та його носія [55].

1.3. Перспективи застосування молекулярно-біологічних маркерів для оцінки агресивності перебігу РМЗ

Гістологічне дослідження дає можливість встановити наявність раку, визначити гістологічну форму (протоковий, дольковий, комбінований) та ступінь диференціювання (високо-, помірно-, або недиференційований рак). Але цього недостатньо для вибору тактики та оцінки ефективності лікування, а також прогнозування перебігу.

Відомі на сьогодні молекулярні прогностичні маркери РМЗ можна розділити на маркери сироватки периферичної крові та пухлинні. Суттєвою перевагою першої групи маркерів є їх мала інвазивність, адже для дослідження достатньо отримати зразки крові хворої (або інших біологічних рідин) за допомогою рутинних методів, тоді як для аналізу пухлинних маркерів необхідним є проведення біопсії або мастектомії. Значною перевагою маркерів сироватки крові є можливість проведення скринінгу умовно здорових людей і формування груп ризику, моніторингу стану організму хворих після проведеної терапії, а також виявлення пухлинного процесу на ранніх стадіях [60].

Скринінг, заснований на тестуванні біологічних рідин, дуже привабливий через мінімальну інвазивність, швидкість і дешевизну процедури забору клінічних зразків [61,62]. Прогностичну значимість у хворих на РМЗ мають такі сироваткові маркери, як сквамозний клітинний антиген 15-3 (CA15-3), раковий ембріональний антиген (РЕА), муциноподібний раковий антиген (МСА), Tag 12 [63].

Широке застосування СА 15-3 знайшов насамперед при прогнозуванні

перебігу захворювання для раннього виявлення субклінічних рецидивів РМЗ. Так, безрецидивний 5-річний період спостерігається менше ніж у половини хворих із високим вихідним рівнем СА 15-3 ($> 30,0$ од./мл). Тому вважається, що підвищення його рівня СА 15-3 може слугувати аргументом на користь призначення ад'ювантного лікування у радикально оперованих хворих. Відзначається висока чутливість СА 15-3 при виявленні рецидивів РМЗ і віддалених метастазів. У цілому зміна рівня даного антигену в процесі динамічного спостереження за хворими на РМЗ, як правило, корелює із клінічним перебігом хвороби. Таким чином, СА 15-3 у даний час використовується для визначення прогнозу і моніторингу стану хворих на РМЗ у процесі лікування, а також для динамічного спостереження за цими пацієнтками. В той же час встановлено, що з одного боку, СА 15-3 дозволяє здійснювати доклінічне виявлення рецидивів, а з іншого — має низьку чутливість при виявленні поодиноких кісткових метастазів. Відносно низька чутливість СА 15-3 обмежує можливості його використання для ранньої діагностики РМЗ. Для підвищення чутливості і специфічності діагностики у моніторингу хворих на РМЗ використовується визначення декількох пухлинних маркерів [63-65].

Раковий ембріональний антиген (РЕА). Верхня межа норми РЕА для осіб, що не палять, складає $5,0$ нг/мл, для курців верхня межа дорівнює $7,0$ – $10,0$ нг/мл. Помірне (до $10,0$ нг/мл) підвищення рівня РЕА може спостерігатися при різноманітних не пухлинних захворюваннях: цирозі печінки, гепатиті, виразковому коліті, бронхіті, пневмонії, туберкульозі, ендометріозі, аутоімунних захворюваннях. У цих випадках рівень РЕА знижується паралельно з клінічним поліпшенням при лікуванні. Рівень РЕА підвищується у хворих із злоякісними пухлинами органів шлунково-кишкового тракту, легені, жіночої статеві системи. За даними літератури діагностична чутливість РЕА для первинних хворих на РМЗ складає $17,4\%$, у хворих без метастазів рівень маркера, як правило, не перевищує норми. У групі хворих із наявністю

метастатичного ураження підвищення рівня РЕА ($> 5,0$ нг/мл) виявляють більш ніж у половини хворих. У процесі динамічного спостереження за хворими роль РЕА для виявлення метастазів і рецидивів раку зростає, динаміка його змін у більшості випадків співпадає з клінічним перебігом хвороби. Проте, на думку більшості дослідників, РЕА як самостійний маркер для моніторингу перебігу РМЗ менш придатний, ніж СА 15-3, оскільки рівень останнього чіткіше корелює із клінічним перебігом хвороби. Але при поєднанні обох маркерів точність діагностики підвищується [63, 66].

Верхня межа норми муциноподібного асоційованого антигену (МСА) становить 11,0 од./мл. Підйом рівня МСА може спостерігатися при вагітності, мастопатії і у 20% випадків при не пухлинних захворюваннях печінки. Для раннього виявлення РМЗ цей маркер непридатний завдяки низькій діагностичній чутливості (10,0–20,0% при специфічності 90,0%). МСА, так само як і СА 15-3, є стадієспецифічним маркером, і його рівень частіше (до 80% випадків) підвищується при розповсюдженому РМЗ [63].

Іншу велику групу складають пухлинно-асоційовані маркери, тобто показники, які визначаються безпосередньо у зразках пухлинної тканини молочної залози. Визначення цих маркерів дозволяє більш ґрунтовно оцінити зміни, які відбулися у молочній залозі, зокрема, адгезивні та інвазивні властивості пухлинних клітин, їх проліферативну активність, порушення регуляції апоптозу, секреції факторів росту, внутрішньоклітинної передачі сигналів, активації систем детоксикації тощо. Така інформація може бути корисною для планування терапії та прогнозування перебігу захворювання [67].

Основними пухлинними прогностичними маркерами РМЗ на сьогодні є показники, що відповідають за диференціювання пухлини (Her2/neu, p53), кінетику проліферативної активності (Ki-67), апоптозу (Bcl-2, Вах, CD95L), ангиогенезу (стимулятори ангиогенезу, в тому числі VEGF). Активно вивчаються й інші фактори, за використання яких можна передбачати медикаментозну резистентність до певних видів хіміотерапії: тимідилат синтетаза, тимідин

фосфорилаза [68, 69].

При прогнозуванні перебігу РМЗ значну увагу приділяють дослідженням розвиненості судинного русла в пухлинному вузлі. Для цього застосовують методи на основі антитіл проти антигенів VIII фактора згортання крові (Віллебранда) та рецепторів CD31 і CD34. При цьому підраховують щільність судин у пухлині та інші параметри [70, 71]. Встановлено пряму кореляцію між щільністю мікросудин та експресією мутантного p53 при не інвазивних формах РМЗ [72]. Ryska A. зі співавт. (2001) виявлено зв'язок між високою проліферативною активністю РМЗ і щільністю мікросудин [73]. Існують також дані про зв'язок високої щільності мікросудинного русла з вираженою запальною інфільтрацією стромы при інвазивних формах РМЗ [74].

Генетичні дослідження дозволили виявити білки, характерні для новоутворень РМЗ, які метастазують в головний мозок. Насамперед, це стрес-індуцибельний протеїн REDOX і білки системи детоксикації, метаболізму глюкози і ліпідів (ARFGAP, RNF25, ENMT2, TOP1, RNPC2, eIF-3, MCM4, FN 14, INHA) [75].

Фактор росту гепатоцитів (ФРГ або Met), що синтезується фібробластами посилює інвазивні властивості пухлини [76]. Щодо питання про можливість виділення ФРГ самими пухлинними клітинами існують різні думки. Деякі науковці визнають таку можливість, інші автори — ні [77]. ФРГ при впливі на пухлинні клітини призводить до зниження рівнів E- і P-кадгеринів, що в свою чергу викликає порушення міжклітинних взаємодій і набуття здатності до інвазії і метастазування. Пухлинні клітини продукують протеолітичні ферменти металопротеази (ММР), які ведуть до деградації клітинного матриксу, що лежить в основі інвазивного росту і метастазування. Доведено, що TGFβ викликає посилення експресії активатора плазміногену та ММР-9, яка розщеплює колаген IV типу (базальні мембрани). ММР-1 і ММР-7 мають фібробластичне походження. Експресія ММР-7 корелює з розміром пухлини, глибиною інвазії і метастазуванням. Крім того, TGFβ стимулює зміну фенотипу

фіброblastів на міофіброblastи, в яких імуногістохімічно визначається актин. Міофіброblastи через сигнальну систему N-кадгерину і β -катеніну сприяють інвазії пухлинних клітин у позаклітинний матрикс, судини, периневральний простір. Міофіброblastи відрізняються від фіброblastів рецептором до FGF10 і більш високою продукцією HGF. Висока проліферативна активність фіброblastів у центрі пухлинного вузла інфільтративного протокового раку збільшує ризик розвитку метастазів у лімфовузли та віддалені органи [69, 78-81].

Незважаючи на результати численних досліджень, зв'язок гетерогенності пухлинних клітин з агресивністю перебігу злоякісного процесу РМЗ потребує більш детального дослідження так як сироваткові та пухлинно-асоційовані маркери, які на сьогодні використовуються в рутинній практиці не дозволяють з високою точністю здійснювати прогнозування перебігу РМЗ та визначати агресивність перебігу пухлинного процесу.

1.4. Роль порушень метаболізму заліза у виникненні та прогресії РМЗ

Результати численних досліджень останніх років дозволяють розглядати РМЗ як феротоксичну хворобу. Аргумент про те, що залізо може сприяти розвитку цієї онкопатології, підтверджується як епідеміологічними даними, так і експериментами проведеними в системі *in vivo*, які послідовно демонструють, що порушення метаболізму заліза в організмі може сприяти прогресуванню РМЗ. Залізо може виступати в ролі ініціатора канцерогенезу: завдяки своїй участі в реакціях Фентона воно може підвищити продукування активних форм кисню, які призводять до появи аддуктів ДНК. Друга роль заліза пов'язана з його функцією як основного фактора росту: потреби пухлини у залізі сильно зростають, а отже зміни в шляхах імпорту та утилізації можуть бути одними з ключових метаболічних змін, які спостерігаються при розвитку раку. Є свідчення проте, що залізо відіграє дуалістичну роль при РМЗ [82, 83].

Окрім класичної ролі заліза як вирішального елемента для проліферації клітин та ко-канцерогенної поведінки, існує ще один шлях, за допомогою якого воно може сприяти канцерогенезу молочної залози. Як відомо, метаболізм естрадіолу є ключовим етапом розвитку РМЗ [84], а окисно-відновний цикл метаболітів катехолестрогену генерує кисневі радикали [82]. Встановлено, що під дією цитохрому Р450 внаслідок окиснення метаболітів естрогену відбувається вивільнення Fe^{2+} з феритину, який, у свою чергу, генерує гідроксильні радикали за допомогою реакції Фентона. [85]. Крім того, згідно результатів Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANESIII), паралельні та зворотні зміни відбуваються між рівнями естрогену та заліза під час переходу в менопаузу [86]. Поки рівень естрогену знижується внаслідок припинення функції яєчників, рівень заліза, як правило, зростає внаслідок призупинення менструацій [87, 88]. Хоча сироваткові рівні естрогену знижуються після менопаузи, концентрації 17β -естрадіолу в тканині молочної залози істотно не відрізняються у жінок у стані пре- і пост-менопаузи, у зв'язку з гіперекспресією циклооксигенази типу II і, як наслідок збільшення продукції простагландину E_2 , який стимулює біосинтез естрогену [89]. Також припускається, що залізо може взаємодіяти з естрогеном двома різними шляхами: низький вміст заліза може стимулювати активацію HIF-1 α і, отже, стимулювати ангіогенез, в той час як високий вміст заліза може сприяти оксидативному стресі.

У цьому ж аспекті не менш важливе значення відводиться білкам, залученим в обмін заліза [4, 5]. Основними їх функціями є транспорт, контроль та підтримання гомеостазу заліза, функціональної активності клітин, регуляція клітинного циклу, а також процесів проліферації. 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 мінімілізує його здатність брати участь у реакціях генерації вільнорадикального окиснення, а отже знижує ймовірність

оксидативного ушкодження клітин і тканин організму [13]. На сьогодні вже існує достатньо інформації про особливості метаболізму феритину (ФР), трансферину (ТФ), феропортину у жінок із РМЗ [16-18].

Встановлено, що ФР є найбільш інформативним індикатором запасу заліза в організмі, він здійснює депонування заліза у фізіологічно доступній для організму формі [90]. Рівень цього протеїну у сироватці крові прямо пропорційний вмісту заліза та підвищується за наявності низки онкологічних захворювань [91, 92], зокрема і при РМЗ. Показано, що рівень ФР у тканині РМЗ підвищений у 6 разів порівняно з доброякісними ураженнями [92]. Встановлено, що високі показники експресії ФР в пухлинній тканині хворих на РМЗ з агресивним перебігом РМЗ [93].

Транспорт іонів Fe в плазмі крові відбувається через утворення комплексу заліза з білком плазми апотрансферином. Для зв'язування з апотрансферином залізо має бути окислене до Fe^{3+} , що здійснюється церулоплазміном. Одна білкова молекула ТФ може транспортувати максимально два іона Fe^{3+} . Залізо в сироватці майже повністю пов'язано з ТФ. Зниження концентрації ТФ відзначено при злоякісних новоутвореннях різного генезу, а також в умовах запалення [94]. Встановлено, що ТФ який синтезується клітинами РМЗ, може бути додатковим фактором аутокринного росту і надавати селективні переваги швидко проліферуючим клітинам РМЗ і, можливо, дозволяє рости пухлинним клітинам у слабо васкуляризованих умовах [95]. Також показано, що при інвазивному РМЗ рецептор ТФ 1 не тільки експресується в пухлинах молочної залози, але й є маркером несприятливого прогнозу. Високий рівень експресії рецептор ТФ1 пов'язаний з поганою відповіддю на тамоксифен і низькими показниками виживаності хворих на РМЗ. Останні дані про те, що рецептор ТФ 1 пов'язаний з фосфорилуванням Src в клітинах РМЗ дозволяють припустити, що регуляція цього рецептора може не тільки підвищити поглинання заліза, а й сприяє виживанню клітин шляхом участі у сигнальних шляхах.

Варто також зазначити про участь Гепсидину (Гп) як ключового регулятора системного метаболізму заліза при розвитку та прогресії РМЗ. Експериментально доведено, що Гп може бути негативним регулятором захоплення заліза в тонкому кишечнику і його виходу з макрофагів для забезпечення нормального еритропоезу. Інформація у доступній науковій літературі свідчить про зв'язок між показниками рівня Гп у сироватці крові та його вмістом у пухлинних клітинах з агресивністю клінічного перебігу злоякісних новоутворень. Зокрема, високий рівень Гп визначається у сироватці крові хворих на рак нирки і легені та корелює з наявністю метастазів. Показано, що зниження експресії феропортину та підвищення експресії Гп у пухлинній тканині корелює з агресивністю РМЗ і низькою виживаністю хворих. Встановлено наявність достовірних кореляційних зв'язків між експресією Гп і РЕ у пухлинах і проліферативною активністю їх клітин [96].

Згідно даних літератури церулоплазмін, ФР, ТФ, ЛФ, металотіонеїни є однією з основних складових антиоксидантної системи. Висловлюється припущення, що зниження функції антиоксидантних протеїнів може призводити до підвищення генерації активних форм кисню. В останні роки з'явилися повідомлення про існування кореляційного зв'язку між порушенням оксидантного/антиоксидантного балансу та ефективністю неoad'ювантної терапії хворих на РМЗ. Існують дані, що концентрація заліза та протеїнів, що беруть участь у його регуляції у сироватці крові та пухлинній тканині, корелює з агресивністю РМЗ [55].

1.5. Зміни показників лактоферину при пухлинному рості в молочній залозі

Найменш вивченим серед вищезазначеної низки білків обміну заліза щодо причетності до патогенезу, клінічного перебігу та прогнозу РМЗ залишається ЛФ – залізовв'язуючий глікопротеїн, що належить до родини трансферинів та здійснює перенесення заліза в клітини, забезпечуючи контроль

рівня «вільного» заліза в крові та біологічних рідинах.

З моменту відкриття ЛФ у 1939 р його було ідентифіковано у плазмі крові, він є одним з основних компонентів практично всіх екзокринних секретів ссавців, таких як слина, жовч, слюзи, секрет підшлункової залози, назальний і бронхіальний секрет, сім'яна рідина, тощо [97]. Доведено, що рівень ЛФ може змінюватись залежно від статі і віку, хоча результати різних досліджень носять суперечливий характер.

У людини ген ЛФ розташований на третій хромосомі в області p21.3 (рис. 1.1.). Цікаво, що втрата гетерозиготності по цій області (в результаті делецій) розглядається як один з факторів, що сприяють розвитку злоякісних пухлин різного гістогенезу [98]. Регуляція синтезу ЛФ залежить від типу клітин, що продукують цей білок. Так, синтез ЛФ в молочній залозі знаходиться під контролем пролактину [99].

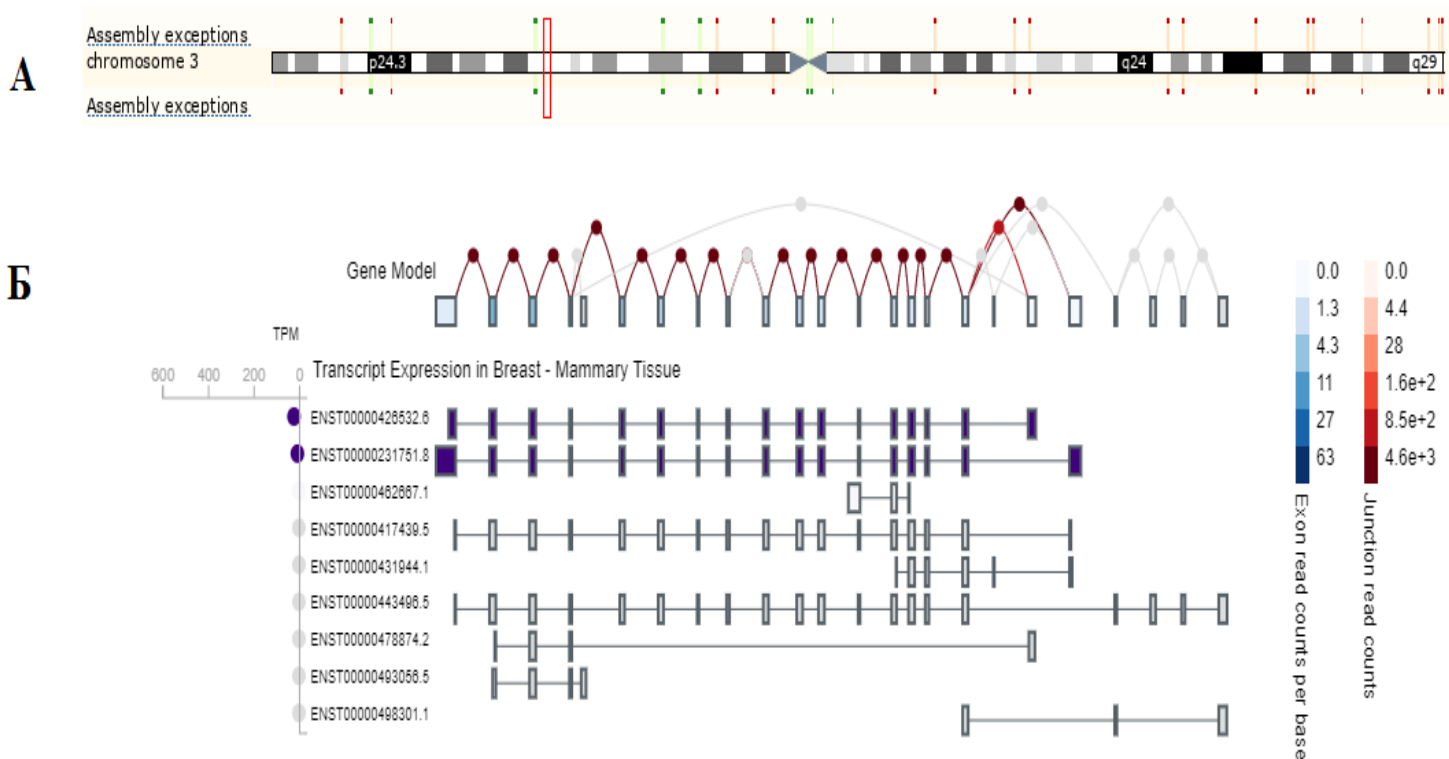


Рис. 1.1. - Ген ЛФ: А - локалізація на 3 хромосомі; Б - схеми альтернативного сплайсингу гену ЛФ у тканині молочної залози людини та розподіл їх за частотами.

Встановлено, що у складі енхансер-промоторної блоку гена ЛФ людини

присутній елемент, відповідальний за зв'язування ER - ERE (estrogen responsive element) і так званий елемент зв'язування стероїдогенного фактора (steroidogenic factor binding element, SFRE) або ж ділянкою зв'язування стероїдного (родинного рецептора естрогену) фактора 1, ER α 1. В експериментах *in vitro* із використанням трансфекції конструктів з геном ERE, встановлено що ERE сам по собі забезпечує істотне підвищення рівня експресії ЛФ у відповідь на дію естрогену. Ця стимуляція збільшується майже вдвічі в присутності SFRE елемента. Ділянки зв'язування ERE і SFRE перекриваються з ділянками зв'язування COUP-TF (chicken ovalbumin promoter transcription factor), що має схожість зі PE і віграє важливу роль в нейрогенезі, органогенезі і ембріогенезі. Зв'язування COUP-TF зі своєю ділянкою розпізнавання в межах енансер-промоторного блоку гена ЛФ є більш стабільним, ніж зв'язування PE. При наявності COUP-TF в достатній кількості активація промотора ЛФ естрагеном пригнічується [100].

Молекула ЛФ складається з одного поліпептидного ланцюга, довжиною ~700 амінокислотних залишків. ЛФ жіночого молока налічує 691 амінокислотний залишок. Його молекулярна маса становить ~80 кДа [101]. На сьогодні встановлено та виділено чотири ізоформи ЛФ з різною молекулярною масою: α -ЛФ, β -ЛФ, γ -ЛФ та δ -ЛФ. Ізоформа α -ЛФ є залізов'язуючою, але не володіє рибонуклеазною активністю. Натомість β - та γ -ЛФ демонструють рибонуклеазну активність, але не здатні зв'язувати залізо. Таке різноманіття ізоформ може бути пояснене різницею в глікозилюванні ЛФ [102]. δ -ЛФ – вкорочена на 25 N-кінцевих амінокислот ізоформа, яка має власну мРНК та експресується в результаті активації альтернативного промотора (P2), що розміщений в першому інтроні гена ЛФ. δ -ЛФ є транскрипційним фактором, а його гіперекспресія призводить до зупинки клітинної проліферації [103].

Альтернативний синтез ЛФ відбувається в нейтрофілах на ранній (мієлоцитарній) стадії їх диференціювання з наступним накопиченням цього білка в цитозольних гранулах (вторинних гранулах нейтрофілів) з можливим

деградуванням під впливом зовнішніх сигналів [101, 102]. У кров ЛФ потрапляє при дегрануляції нейтрофілів і потім швидко зв'язується і поглинається паренхіматозними клітинами печінки та селезінки.

Відповідно до насичення залізом виділяють три форми ЛФ: аполактоферин (вільний від заліза), моноферична форма (зв'язаний один іон Fe^{3+}) і хололактоферин (зв'язано два іона Fe^{3+}) [101]. У зв'язаній формі молекулярна маса ЛФ становить 80 кДа. Зв'язування з залізом відбувається при рН нижче 5,5. Така форма ЛФ більш відкрита, через що вона легко піддається дії протеаз.

ЛФ здатен утримувати залізо навіть при низьких рівнях рН, що має важливе значення, особливо в місцях локалізації інфекції і запалення, де, в зв'язку з метаболічною активністю бактерій, рН може сягати 4,5. Здатність ЛФ до зв'язування заліза в два рази вища, ніж у трансферину, тому за таких умов ЛФ також зв'язує залізо, вивільнене від трансферину, та запобігає його подальшому використанню для бактеріальної проліферації [101]. Особливістю ЛФ є його здатність специфічно зв'язувати іони заліза та деяких інших перехідних металів, таких як Al^{3+} , Ga^{3+} , Mn^{3+} , Co^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} і т. д., однак його спорідненість з цими іонами набагато нижча. Крім того, що ЛФ регулює концентрацію іонів заліза у крові і секретах, він має антимікробну та антивірусну дію, тому його вважають одним з найбільш важливих імунних факторів молока. Поряд з цим, до функцій, в основі яких, ймовірно, лежить комплексоутворююча здатність ЛФ, відносять бактеріостатичну, бактерицидну, фунгіцидну, протівірусну, детоксикуючу дії, а також транспортну функцію [102].

Подальші дослідження показали велику кількість інших можливих функцій, багато з яких не мають відношення до зв'язування заліза, а визначаються його поверхневими властивостями (рис. 1.2) [101, 102].



Рис. 1.2. Функції лактоферину.

ЛФ володіє противірусною активністю відносно РНК- і ДНК- вмісних вірусів людей і тварин. Він інгібує взаємодію вірусу з клітиною хазяїна (вірус простого герпесу, вірус гепатиту В, цитомегаловірус людини, адено-, рома- і поліовіруси) або пригнічують процес реплікації вірусу в інфікованих клітинах (вірус гепатиту С і G, ВІЛ).

ЛФ приймає участь у захисних реакціях організму і регулює функцію імунокомпетентних клітин. Завдяки можливості зв'язувати CO_3^{2-} – та інші аніони, такі як оксалат, карбоксилат, ЛФ також взаємодіє з великою кількістю інших сполук і речовин, таких як ліпополісахариди, гепарин, глікозаміноглюкани, поліаміни і, таким чином, може впливати на метаболізм і розподіл різних речовин [101, 104].

ЛФ відносять до класу серинових протеаз, оскільки їх інгібітори викликають необоротне інгібування активності білка. Сучасними дослідженнями доведено, що ЛФ, взаємодіючи з клітинами, викликає модуляцію таких клітинних сигналів, як активація мітогенактивованих протеїнкіназ (MAP системи) та регуляція експресії певних генів. Вплив на клітини макроорганізму ЛФ реалізує, взаємодіючи з мультилігандними рецепторами — LRP1, LRP2 (low-density lipoprotein receptor-related proteins-1, -2), що розташовані на макрофагах, тромбоцитах, і зі специфічним рецептором ЛФ, який експресується на моноцитах, лімфоцитах, гепатоцитах та епітеліоцитах тонкого кишечника. Після взаємодії з рецепторами ЛФ

інтерналізується клітиною [102].

Здатність зв'язуватись з нуклеїновими кислотами є однією з найбільш важливих властивостей даного білка. ЛФ може взаємодіяти з дрейфуючим між мембранною поверхнею і клітинним ядром поверхневим нуклеоліном. Проникаючи в ядро клітини, ЛФ зв'язується з специфічними ділянками ДНК, і таким чином регулює процеси транскрипції генів, продукти яких беруть участь у регуляції різноманітних фізіо- і патофізіологічних процесів. Встановлено, що при взаємодії з одно- і дволанцюговою ДНК, ЛФ швидше зв'язується з останньою. Висловлюється припущення, що N-кінцева сигнальна послідовність GRRRR ЛФ людини забезпечує його здатність проникати в ядро і виступати в якості фактора транскрипції. Встановлено, що ця послідовність характерна тільки для людського ЛФ і не зустрічається у тварин [102, 104].

Показано, що ряд функціональних властивостей ЛФ може визначатись його олігомерним станом. Так, у вигляді мономеру ЛФ здатний до міцного зв'язування з ДНК і регуляції процесів гранулопоезу, тоді як ЛФ у вигляді тетрамера не володіє зазначеними властивостями [105, 106]. Для полімеризації ЛФ важливе значення має наявність іонів кальцію Ca^{2+} .

При вивченні протипухлинної активності ЛФ необхідно враховувати його імуномодулюючі властивості. У ряді експериментів було показано, що ЛФ стимулює проліферацію і активацію таких імунних клітин, як лімфоцити і нормальні клітини-кілери, а з іншого боку він збільшує чутливість і доступність пухлинних клітин до “атаки” захисних клітин.

ЛФ проявляє пряму дію на клітинний ріст, завдяки чому може виступати в якості регуляторного елементу в захисті організму від розвитку пухлин і метастазів [101].

Нещодавно було встановлено, що ЛФ, крім активації нормальних клітин-кілерів, посилює активацію CD4^+ і CD8^+ лімфоцитів. Підвищення системної імунної відповіді спостерігалось навіть при пероральному введенні ЛФ. Дослідження механізму дії ЛФ як засобу, що пригнічує розвиток пухлинних

клітин, показали, що важливу роль у цьому процесі відіграє ІЛ-18, який є потужним активатором клітин імунної системи. Експресія саме цього цитокіну посилюється в присутності ЛФ у клітинах кишкового епітелію, а також відбувається активація протеази каспази-1, яка необхідна для ферментативного процесингу ІЛ-18. Вважається, що саме секреція ІЛ-18 у кишечнику та клітинах крові відіграє центральну роль у координації системної та локальної імунної відповіді. Механізм та активація синтезу ІЛ-18/каспази-1 можливий через зв'язування ЛФ з рецептором кишкової або локальної імунної клітини з подальшою передачею сигналу в ядро. Крім того, в експериментах *in vitro* та *in vivo* доведено, що ЛФ, як і ІЛ-18, володіє антиангіогенною активністю, яка в злоякіснотрансформованих клітинах дуже висока [107].

Досліди на культурах клітин показали здатність ЛФ стимулювати апоптоз та інгібувати проліферацію, блокуючи перехід з G1-фази клітинного циклу в S фазу [108, 109]. Ці дані свідчать про те, що ЛФ володіє вираженою протипухлинною дією, яка базується на запуску механізмів апоптозу.

В експериментах *in vivo* встановлено, що ЛФ збільшує час появи перших пухлинних вузлів та гальмує швидкість росту експериментальної пухлини РШМ-5 у мишей. Порівняльні дослідження рівня експресії гена ЛФ в нормальному епітелії шийки матки та аденокарциномі шийки матки показали значне зменшення експресії гена ЛФ в пухлинній тканині [110]. На клінічному матеріалі хворих на поліпоз кишечника встановлено, що тривале введення ЛФ пацієнтам у високих дозах не було токсичним і призводило до уповільнення росту поліпів [111]. У сукупності наведені дані літератури дають підставу вважати, що ЛФ, з одного боку, можна розцінювати як інгібітор росту пухлини, а рівень його експресії як маркер розвитку пухлини.

У доступній літературі є лише нечисленні повідомлення, присвячені вивченню експресії ЛФ у пухлинних клітинах та його вмісту у периферичній крові хворих на РМЗ. В одному із досліджень показано, що експресія ЛФ у пухлинних клітинах корелює з наявністю у новоутворенні рецепторів

естрогену, а рівень ЛФ в крові хворих на РМЗ зі зниженням концентрації естрадіолу. В іншому дослідженні встановлено, що у 34% хворих концентрація ЛФ у сироватці була нижче референтних значень. У той же час Rossiello R. та співав. показали, що більш ніж у 50% досліджених хворих на РМЗ концентрація ЛФ у периферичній крові перевищувала верхні границі норми [112]. Schuls D. et al. (2009) за допомогою масс-спектрометрії встановили значне підвищення рівня експресії ЛФ у тричі рецептор-негативному РМЗ [113].

Отже недостатня та суперечлива інформація щодо значення ЛФ у клінічному перебігу пухлинного процесу та можливостей широкого використання цього протеїну у клінічній практиці доцільними є подальші дослідження у такому напрямку.

РЕЗЮМЕ

Згідно останніх даних статистики, РМЗ займає лідуючі позиції за показниками захворюваності та смертності в структурі онкологічних захворювань як в Україні так і в світі. Існуючі нині проблеми в своєчасній діагностиці РМЗ, прогностуванні перебігу пухлинного процесу і відповіді на терапію, як вважається, пов'язані з неоднозначними клінічними проявами пухлинного процесу та відмінностями морфолого-генетичних характеристик пухлин. Незважаючи на результати численних досліджень, зв'язок гетерогенності пухлинних клітин з агресивністю перебігу злоякісного процесу РМЗ потребує більш детального дослідження так як сироваткові та пухлинно-асоційовані маркери, які на сьогодні використовуються в рутинній практиці не дозволяють з високою точністю здійснювати прогностування перебігу РМЗ та визначати агресивність перебігу пухлинного процесу. А ідентифіковані протягом останніх десятиліть із застосуванням молекулярно-генетичних методів досліджень молекулярно-генетичні підтипи РМЗ, що відрізняються особливостями перебігу і прогнозу не ввійшли в широку клінічну практику

через свою дороговартісність та відсутністю висококваліфікованого персоналу, що володіє методами аналізу генної експресії.

Згідно даних літератури, сьогодні РМЗ можна розглядати з точки зору феротоксичної хвороби, так як встановлено, що порушення метаболізму заліза в організмі може сприяти прогресуванню цього захворювання. Відомо, що на клітинному і молекулярному рівні регуляція обміну заліза забезпечується через злагоджену дію залізовмісних білків, у тому числі білків-переносників заліза. Основними їх функціями є транспорт, контроль та підтримання гомеостазу заліза, функціональної активності клітин, регуляція клітинного циклу, а також процесів проліферації.

Найменш вивченим щодо причетності до патогенезу, клінічного перебігу та прогнозу РМЗ залишається ЛФ — залізовв'язуючий глікопротеїн із сімейства трансферинів — білків переносників заліза. Окрім метал-хелатуючої функції ЛФ, доведена його участь у проліферації та диференціації різних типів клітин, захисті організму від мікробних інфекцій, а також у антизапальній та протипухлинній активності. Показано, що ЛФ експресується клітинами молочної залози, матки та мієлоїдними клітинами із наступним надходженням білка у біологічні рідини. Наявна в літературі інформація щодо його участі в процесах канцерогенезу є доволі суперечлива і з одного боку ЛФ може бути інгібітором пухлинного росту, а з іншого - рівні його експресії можна розцінювати як можливий маркер розвитку пухлини.

З огляду на це, актуальним є визначення клініко-патологічного та молекулярно- біологічного значення ЛФ при РМЗ шляхом дослідження його показників в системі *in vitro* та *ex vivo* на клінічному матеріалі.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота має комплексний характері включає результати експериментальних досліджень в системі *in vitro* (культури клітин 4 ліній РМЗ), а також результати комплексних обстежень 151 хворої на РМЗ I-II стадії із застосуванням сучасних та інформативних методів обробки видалених пухлин відповідно до поставлених задач. Хворі знаходились на стаціонарному лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі (головний лікар – О.М. Ключов) протягом 2013–2015 рр. і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях.

2.1. Об'єкти досліджень в системі *in vitro*

2.1.1. Клітинні лінії, умови культивування *in vitro*

Експериментальні дослідження *in vitro* проведені на клітинних лініях РМЗ людини – MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, які були отримані з клітинного банку ліній тканин людини та тварин Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України Клітини досліджених ліній РМЗ культивували у зволоженій атмосфері з 5% CO₂ при температурі +37°C, використовуючи відповідні для їх росту культуральні середовища. Клітини T47D культивували в середовищі RPMI – 1640 (Sigma) з додаванням 0,2 од / мл бичачого інсуліну та 10% фетальної бичачої сироватки; клітини MCF-7 культивували в середовищі Ігла (Sigma) з додаванням 0,01 мг/мл рекомбінантного інсуліну людини і 10% ФБС; клітини ліній MDA-MB-231 та MDA-MB-468 культивували у середовищі Лейбовіц L-15 (Sigma) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки. Клітини пересівали двічі на тиждень з щільністю посіву $2-4 \times 10^4$ клітин на 1см² поверхні флакону для культивування.

Пересів клітин робили, коли 50% поверхні флакону для культивування було зайнято клітинами [114].

Ступінь злоякісності клітинних ліній РМЗ оцінювали за такими молекулярно-біологічними характеристиками як рецепторний статус (профіль експресії РЕ, РП, Her2/neu), проліферативна активність (маркер проліферуючих клітин Ki-67), показники експресії маркерів міжклітинного адгезії (CD44, E- та N-кадгерин) [115-118] 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 (табл. 2.1). 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.

Таблиця 2.1

Розподіл досліджених клітинних ліній РМЗ за ступенем злоякісності

Лінія клітин РМЗ	Рівень експресії молекулярних маркерів (H-score, бали)						Показник інвазії, x10 ³ клітин	Ступінь злоякісності
	PE	PP	Ki-67	E-cadh	N-cadh	CD44		
T47D	89,2±2,4	83±1,6	89±1,4	251 ± 5,0	53 ± 2,4	79 ± 3,1	0,085	Низький
MCF-7	288±14,7	291±12,0	291±15,4	268 ± 16,8	59 ± 5,1	72 ± 2,8	0,087	Низький
MDA-MB-231	0	0	268±1,9	49 ± 1,3	31 ± 0,7	298 ± 0,7	0,345	Високий
MDA-MB-468	0	0	249±2,7	259 ± 2,5	18 ± 0,8	167 ± 5,0	0,193	Високий

2.1.2. Загальна клінічна характеристика хворих на РМЗ

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 [119, 120].

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.

Неoad'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 напісляопераційний 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.

Як свідчать клініко-патологічні дані РМЗ, вік хворих коливався від 28 до 89 років, середній вік становив $50,5 \pm 11,6$ років. Детальний розподіл хворих за віком показав (рис. 2.1), що найбільша кількість хворих (55%) була у віковому інтервалі 51 – 70 років.

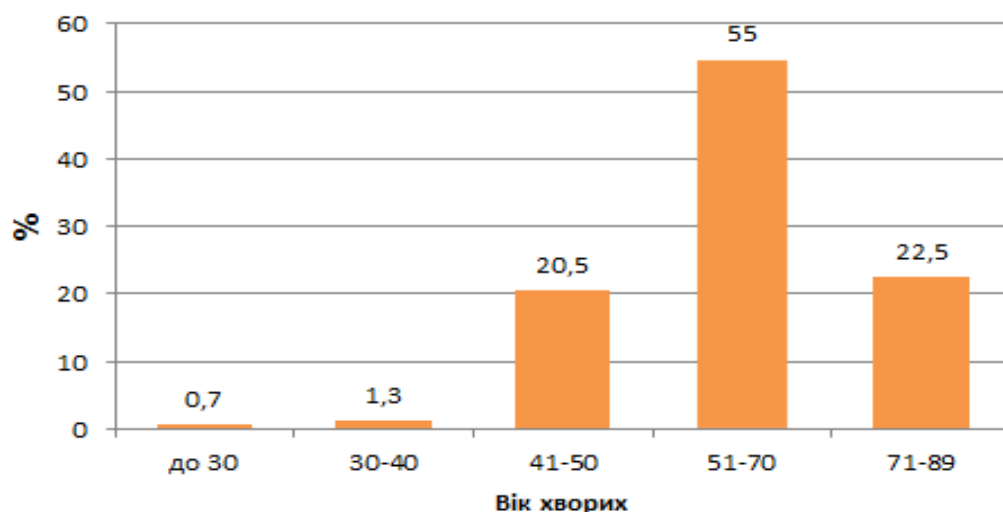


Рис. 2.1. Розподіл хворих (%) на РМЗ I-II стадії за віком.

Кількість хворих віком до 30 років була невеликою і становила 0,7%, зі зростанням віку кількість хворих збільшувалась: від 1,3% у хворих 30-40 років до 20,5% у хворих 41-50 років і до 22,5% у віковому інтервалі хворих 71-89 років. Загальна клінічна характеристика хворих подана у табл. 2.2.

Як видно з наведеної таблиці, серед обстежених більшу кількість становили хворі на РМЗ II стадії (104/68,9%), серед яких у 81 (53,6%) була стадія T2a, у 23 (15,3%) - стадія T2b. У 80,8 % хворих була менопауза, менструальна функція була збережена у 29 (19,2%). Метастатичні ураження регіонарних лімфатичних вузлів діагностовані у 42 (27,8%) пацієнток, тоді як віддалені метастази при комплексному (рентгенологічному, ультразвуковому, лабораторному) обстеженні хворих до хірургічного лікування не були діагностовані.

Клінічна характеристика пухлин хворих на РМЗ

Показник	Кількість хворих	
	N	%
Загальна кількість хворих	151	100
Вік хворих (роки)		
Середній	50,5±11,6	
Коливаннявіку	28-89	
Менструальний цикл		
Збережений	29	19,2
Менопауза	122	80,8
Стадія РМЗ за TNM		
I	47	31,1
II	104	68,9
Стадія РМЗ за TNM (категорія N)		
N0	103	68,2
N1	42	27,8
Nx	6	4,0
Гістологічнийтип		
Інфільтративнийдуктальний рак	101	66,9
Інфільтративнийлобулярний рак	50	33,1
Ступіньдиференціювання		
G1 (високий)	42	27,8
G2 (помірний)	78	51,7
G3 (низький)	31	20,5
Молекулярнийпідтип		
Люмінальний A(ER+, PR+, Her2/neu-)	81	53,6
ЛюмінальнийБ (ER+, PR+, Her2/neu+)	35	23,2
Базальний (ER-, PR-, Her2/neu-)	35	23,2

Морфологічне дослідження операційного матеріалу показало, що частіше діагностувався інфільтративний дуктальний – 66,9 % хворих, ніж інфільтративний лобулярний (33,1 %) РМЗ, при цьому у більшості хворих (51,7%) визначено помірний ступінь диференціювання пухлин, високий

ступінь диференціювання діагностовано у 27,8 % хворих, у найменшій кількості хворих (20,5%) був низький ступінь диференціювання РМЗ.

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 та інші, що відображено на рис. 2.2.

За імуногістохімічною характеристикою досліджені пухлини 151 хворої поділялись на 3 молекулярні підтипи (рис. 2.3): люмінальний А (ER+, PR+, Her2/neu-), частота якого була найбільшою, – 81(53, 6 %); люмінальний Б (ER+, PR+, Her2/neu+) – 35(23,2%); базальний (або тричі негативний підтип) (ER-, PR-, Her2/neu-) – 35 (23,2 %).

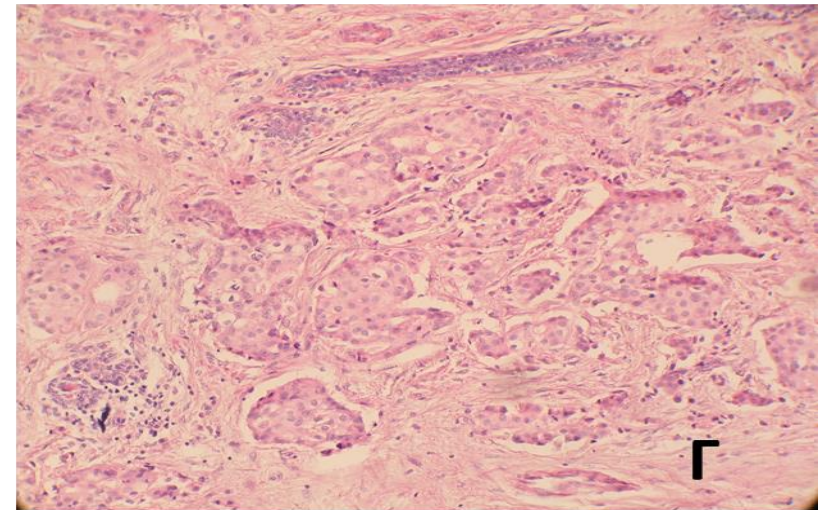
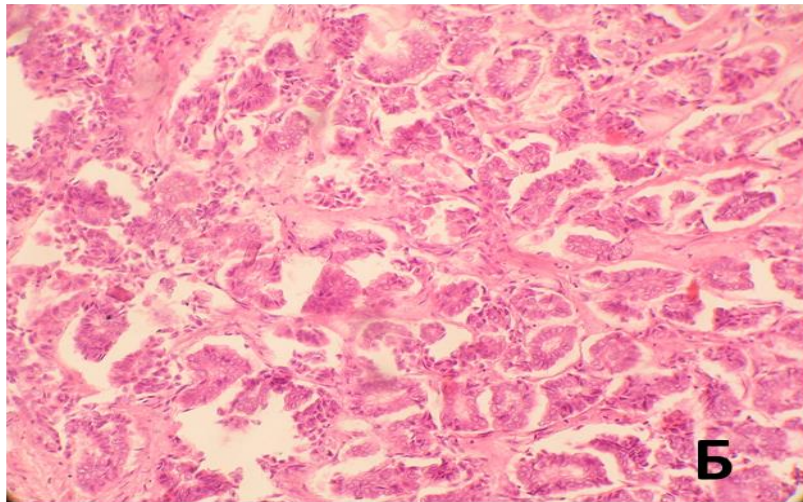
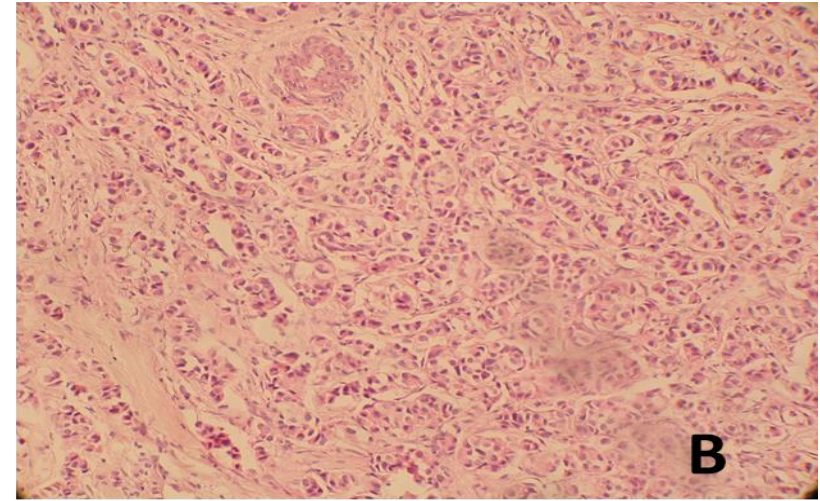
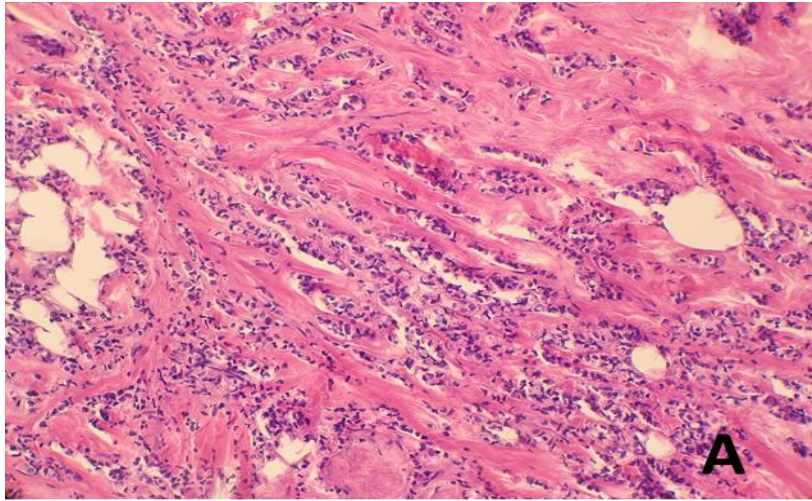


Рис. 2.2. Морфологічні типи росту клітин РМЗ. Гематоксилін та еозин, х200

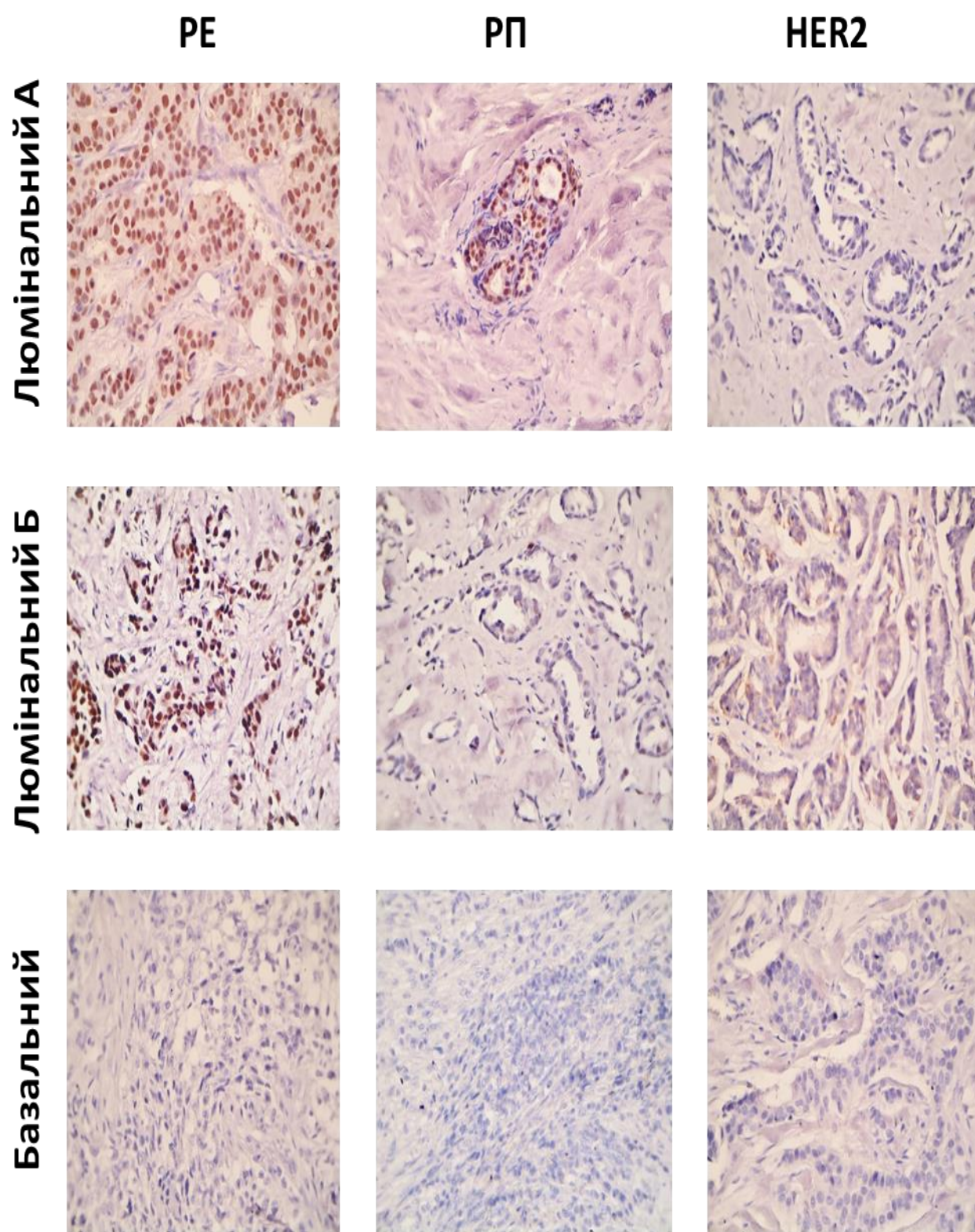


Рис. 2.3. Імуногістохімічні особливості досліджених молекулярних підтипів РМЗ, дофарбування гематоксиліном, $\times 400$

2.2. Методи експериментального дослідження клітинних ліній РМЗ

2.2.1. Метод цитоморфологічного дослідження клітин РМЗ в експериментальній системі *in vitro*

Морфологічні дослідження клітинних ліній РМЗ проводили після фарбування цитологічних препаратів клітин за Романовським-Гімза.

Для виготовлення цитологічних препаратів клітини вирощували протягом однієї доби за стандартних умов на покривних скельцях, які знаходилися в стерильних чашках Петрі, заповнених культуральним середовищем. Через добу поверхня скелець була зайнята клітинами на 80%. Скельця діставали з чашок Петрі, відмивали від залишків середовища у фізіологічному розчині та фарбували за Романовським-Гімза.

На першому етапі фарбування на скельця наносили азур-еозин за Романовським у розведенні 1:5 на 1 хвилину. Потім, не змиваючи барвник, на скельця додавали декілька крапель дистильованої води на 30 секунд. Барвник змивали проточною водою. На другому етапі обробки препаратів проводилось фарбування досліджених клітин розчином Майн-Грюнвальда, який наносили на скельця на 45 секунд з подальшим відмиванням проточною водою та підсушуванням. Препарати досліджували за допомогою імерсійної системи мікроскопа PrimoStar (Zeiss, Німеччина) при збільшенні 1000.

2.2.2. Імуноцитохімічний метод дослідження клітин РМЗ *in vitro*

У системі *in vitro* у клітинах РМЗ різного ступеня злоякісності експресію молекулярних маркерів досліджували за допомогою імуноцитохімічного методу. Для проведення імуноцитохімічного аналізу пухлинні клітини вирощували на покривних скельцях протягом 1 доби, після чого фіксували розчином метанолу і ацетону у співвідношенні 1:1 протягом 2 годин при $t = 20^{\circ}\text{C}$, після чого досліджували експресію молекулярних маркерів із

застосуванням відповідних моноклональних антитіл (табл. 2.3).

Таблиця 2.3

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

Молекулярний маркер	Клон	Розведення	Фірма - виробник
PE	1D5	1:50	DakoCytomation, Denmark
PP	PgR636	1:50	DakoCytomation, Denmark
Рецептор епідермального фактора росту HER2/neu	e2-4001	1:50	ThermoScientific, USA
Ki-67	MIB-1	1:100	DakoCytomation, Denmark
Е-кадгерин	NCH-38	1:100	ThermoScientific, USA
N-cadherin	CD235	1:100	DiagnosticBioSystems, USA
CD44	SP37	1:300	MásterDiagnóstica, Spain
CD24	SN3b	1:200	ThermoScientific, USA
Лактоферин		1:300	ThermoScientific, USA

Для детекції реакції використовували систему візуалізації LabVision™ UltraVision™ QuantoDetectionSystem (кон'юговані вторинні антитіла antiMouse з полімерним ланцюгом декстринової молекули) фірми “ThermoScientific”, USA, склад якої наведено в таблиці 2.4. Після проведення імуноцитохімічної реакції препарати промивали водою та дофарбовували гематоксилином Майєра (“ThermoScientific”, USA) протягом 15 – 30 секунд і заключали в FaramountAqueousMountingMedium (“ThermoScientific”, USA). Таблиця 2.4

Склад реагентів системи детекції

№	Назва реагенту	Об'єм
1	UltraVisionHydrogenPeroxideBlock	15 мл
2	UltraVisionProteinBlock	15 мл
3	PrimaryAntibodyEnhancer	15 мл
4	HRP Polymer	15 мл
5	DAB QuantoSubstrate	15 мл
6	DAB QuantoChromogen	1 мл

Для перевірки специфічності взаємодії антитіл і, таким чином, отримання достовірних результатів, кожного разу при проведенні імуногістохімічних досліджень ставили контрольні реакції.

Аналіз результатів імуноцитохімічної реакції проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричневе забарвлення цитоплазми та/або ядер) за допомогою світлового мікроскопу PrimoStar (Zeiss, Німеччина), використовуючи збільшення 100-400. Для кількісної оцінки експресії досліджених маркерів при ІЦХ дослідженнях використовували метод H-Score за формулою:

$S = N_0 (\%) + 3 \times N_1 (\%) + 2 \times N_2 (\%) + 1 \times N_3 (\%)$, де S – показник «H-Score», N_0 – кількість клітин з відсутньою експресією, N_1 , N_2 та N_3 – з низькою, середньою та високою експресією, відповідно. Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 50 до 100 балів – низький, від 101 до 200 балів – середній, від 201 до 300 балів – високий рівень експресії [121].

2.3. Методи дослідження клінічного матеріалу

2.3.1. Метод морфологічного дослідження видалених пухлин у хворих на РМЗ

Для верифікації пухлинного процесу проведено гістологічне дослідження операційного матеріалу, зразки якого фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну з наступною проводкою у спиртах зростаючої концентрації та заливкою у парафінові блоки. Загальну структуру пухлин оцінювали при перегляді гістологічних зрізів, пофарбованих гематоксиліном та еозином, гістологічний тип пухлин оцінювали за Міжнародною гістологічною класифікацією пухлин BOOЗ (2002 р.). У 2011 р. ця класифікація була переглянута і видана у 2012р. у вигляді окремого посібника [122], За новою класифікацією вилучено термін «протокова карцинома», замість нього запроваджено термін «інвазійна карцинома неспецифічного типу», щоб підкреслити відмінність цієї карциноми від раку специфічного типу. Причиною такого перегляду стало уявлення, що ці типи раку виникають не з епітелію протоків або дольок молочної залози, а з термінальної дольково-протокової структурної одиниці (TDLU - terminalductlobularunit). Але застосування старого терміну «протоковий рак» або «дуктальний рак»

дозволяється. Оскільки діагнози обстеженим хворим ставились за старою морфологічною класифікацією РМЗ, то у нашій роботі буде використовуватись термін «інфільтративний протоковий (дуктальний) рак» молочної залози.

В операційному матеріалі кожної хворої визначали ступінь структурної та клітинної атипії, на підставі чого визначали ступінь диференціювання пухлин, поділяючи їх на високо- (G1), помірно- (G2) та низько диференційовані (G3) РМЗ.

2.3.2. Визначення вмісту ЛФ в сироватці крові хворих на РМЗ методом твердо фазного імуноферментного аналізу

При верифікованому патогістологічному діагнозі у всіх хворих на РМЗ проводилось визначення рівня ЛФ у сироватці крові за допомогою методу твердо фазного імуноферментного аналізу (ІФА).

Вміст ЛФ у сироватці крові визначали методом ІФА із застосуванням стандартного набору AssayMax™ HumanLactoferrin ELISA Kit (Assaypro LLC, USA) відповідно до інструкції виробника, за допомогою автоматичного біохімічного та імуноферментного аналізатора ChemWell 2990

Імуноферментний аналіз проводили у 96-ти лункових планшетах. Вносили по 50 мкл стандартів та/або сироваток пацієнтів у кожну лунку та інкубували протягом 120 хвилин. Після інкубації планшети відмивали спеціальним миючим буфером 4 чотири рази при перемішуванні та вносили кон'югат антитіл (по 50 мкл/лунку). Планшет інкубували 60 хв при 37°C і відмивали 4 рази миючим буфером. Далі для проведення реакції вносили в лунки планшету SP-кон'югат по 50 мкл в лунку на 30 хв. Планшет знову відмивали та вносили по 50 мкл хромоген субстрату на 10 хв. Зупиняли реакцію внесення по 50 мкл в лунку стоп-розчину і вимірювали оптичну густину за допомогою приладу при довжиною хвилі 450 нм.

Зразки сироватки крові для ІФА отримували згідно рекомендацій, зазначених в інструкціях до наборів. Всі зразки сироватки не містили ознак гемолізу, були центрифуговані при 1500 об/хв. та зберігались при $t = -20^{\circ}\text{C}$.

2.3.3. Дослідження експресії молекулярних маркерів у пухлинній тканині хворих на РМЗ за допомогою імуногістохімічного методу

Для імуногістохімічного дослідження експресії досліджуваних маркерів в пухлинних клітинах використали стандартний стрептавідин-біотин-пероксидазний метод на гістологічних зрізах, виготовлених з парафінових блоків пухлин після їх фіксації у 10% розчині нейтрального формаліну.

Першим етапом імуногістохімічної реакції була депарафінізація гістологічних зрізів. Для цього скельця з гістологічними зрізами занурювали в орто-ксілол на 20 хв. з наступною обробкою 96° етанолом протягом 20 хв та подальшим промиванням у двох порціях дистильованої води по 3 хв. Демаскування антигенів проводили шляхом обробки зрізів у цитратному буфері рН 6,0 в паровій бані (Biosan WB-4MS, Latvia) протягом 20 хв з подальшим з охолодженням при кімнатній температурі. Цитратний буфер виготовляли із 10,0 мл 0,1М розчину лимонної кислоти і 40,0 мл 0,1М розчину цитрату натрію, доведеного до об'єму 500,0 мл дистильованою водою.

Наступні етапи імуногістохімічної реакції були такими:

1. Охолоджували препарати при кімнатній температурі до $+25^{\circ}\text{C}$, двічі промивали у трьох порціях дистильованої води по 2 хв.
2. Проводили блокування ендогенної пероксидази 3 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) рН 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 Ultra V Block протягом 30 хв. при кімнатній температурі.

5.У пухлинній тканині досліджували експресію молекулярних маркерів шляхом застосовування відповідних моноклональних антитіл (Табл. 2.2.1). Інкубацію в оптимальному розведенні моноклональних антитіл на протязі однієї години. Через 30 хвилин зрізи відмивали 3 рази у PBS. Для візуалізації білка застосовували систему UltraVision LP DetectionSystem (кон'юговані вторинні антитіла antiMouse з полімерним ланцюгом декстринової молекули) фірми ThermoScientific (США), яку наносили і залишали на зрізі при кімнатній температурі протягом 30 хв. Забарвлення білка здійснювали за допомогою хромогену – 3,3'-діамінобензидину тетрахлориду, продукт реакції якого має коричневий колір.

6.Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном Майєра.

Для перевірки специфічності взаємодії антитіл і, таким чином, отримання достовірних результатів, кожного разу при проведенні імуногістохімічних досліджень ставили контрольні реакції. У якості позитивного контролю використовували препарати зі зрізами тканин, у яких було встановлено гіперекспресію маркеру. За негативний контроль брали паралельні зрізи пухлин яєчника, на які не наносили моноклональні антитіла.

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження проводили шляхом підрахунку імунопозитивних клітин (коричневе забарвлення цитоплазми та/або ядер) за допомогою світлового мікроскопу PrimoStar (Zeiss, Німеччина), використовуючи збільшення x100-400. 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.

2.3.4. Визначення експресії мікроРНК в пухлинній тканині та сироватці крові пацієнтів з РМЗ

Для дослідження експресії мікроРНК на клінічному матеріалі хворих (в сироватці крові та пухлинній тканині) було застосовано метод ПЛР у реальному часі [123]. Тотальну РНК з парафінових блоків отриманих від хворих на РМЗ виділяли за допомогою комерційного набору “RNeasy FFPE Kit” (QIAGEN, Німеччина), а з сироватки крові – NucleoSpin® miRNA Nucleospin (MACHEREY-NAGEL, Німеччина), згідно протоколу виробника. Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі “NanoDrop 2000c Spectrophotometer” (ThermoScientific, США). Частоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжині хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у трис-ЕДТА буфері та до проведення ПЛР зберігали при $t = -20^{\circ}\text{C}$.

Одноланцюгову ДНК синтезували з 100 нг загальної РНК з використанням набору TaqMan для зворотної транскрипції. Для проведення ПЛР зі зворотною транскриптазою (ЗТ-ПЛР) використовували реакційну суміш, склад якої наведено в Табл. 2.5.

Таблиця 2.5

Склад реакційної суміші для проведення ЗТ-ПЛР

Компоненти реакційної суміші	Кількість компонентів на 5 мкл реакційної суміші (в мкл)
100 мМ суміш дезоксинуклеотидів	0,05
Зворотна транскриптаза Multiscribe, 50 U/мкл	0,33
10х буфер для РТ	0,50
Інгібітор РНКаз	0,06
Вода, очищена від нуклеаз	1,56
5х праймер для міРНК TaqMan	1,00
Зразок загальної РНК	1,50
Всього:	5,0

ЗТ-ПЛР проводили в ампліфікаторі «Терцик» («ДНК-технологія», Росія) з використанням наступних параметрів реакції (Табл. 2.6).

Таблиця 2.6

Температурні умови проведення ЗТ-ПЛР

Крок	Час (хв.)	Температура (С)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	∞	4

QRT-ПЛР проводили на системі виявлення AppliedBiosystems 7900HT FastReal-Time PCR System послідовності з використанням TaqManMicroRNAAssay. Після закінчення ЗТ-ПЛР до продукту реакції додавали суміш реагентів (Табл. 2.7) і проводили ПЛР у реальному часі за заданими умовами (Табл. 2.8).

Таблиця 2.7

Склад реакційної суміші для ПЛР

Компонент реакційної суміші	Кількість на 20 мкл реакційної суміші
2х-універсальна суміш TaqManMastermix (без AmpErase)	10,00
Вода, очищена від нуклеаз	4,00
20х суміш для ПЛР TaqManMicroRNAAssays	1,00

Відносна експресія досліджуваних мікроРНК була визначена порівняльним СТ методом. Дослід проведений у трьох паралелях для кожної лінії, і ПЛР у трьох повторностях для кожного зразка.

Таблиця 2.8

Умови проведення ПЛР (кількість зразка – 20 мкл)

Крок	Активация білка AmpliTaqGold	ПЛР	
	HOLD	Цикл (40 циклів)	
		Денатурація	Подовження ланцюга
Час	10 хв	15 с	60 с
Температура (0С)	95	95	60

Пороговий цикл був усереднений в усіх технічних і біологічних репліках в середині кожної лінії. Різницю фолду (Foldchange, folddifference) між експресією досліджуваних мікроРНК обчислювали за формулою $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Похибки для розрахунків різниці фолду показують діапазон значень $\Delta\Delta Ct$, оснований на включенні стандартного відхилення в ці значення.

Послідовності праймерів, для ЗТ-ПЛР та ПЛР в реальному часі були визначені за допомогою ресурсу <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/> (Табл. 2.9) та синтезовані компанією Metabion, Німеччина.

Послідовності праймерів для визначення експресії мікроРНК

мікроРНК ID	Послідовність зрілої мікроРНК	Stem-loop праймер для синтезу кДНК	Forward праймер
hsa-mir-214	5'- UGCCUGUCUACA CUUGCUGUGC -3'	5'- CTCAACTGGTGTCGTGGA GTCGGCAATTCAGTTGAG GCATTATT-3'	5' - GTTACAGCAGG CACAGACA - 3'

Відповідно до методики stem-loopmiRNA RT-PCR було використано універсальний reverseprimer 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT – 3' для всіх мікроРНК з табл.2.9 [137]. Для досліджень *ex vivo* сироватці крові та пухлинній тканині в якості ендogenous контролю використовували малу ядерцеву RNU48 [139], оскільки рівні U6 не рекомендовано використовувати для нормальних показників циркулюючих мікроРНК. Послідовності праймерів взяті з ресурсу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>: RT-праймер: 5' - CTCTGACC – 3', forward 5' - AGTGATGATGACCCCAGGTAАСТС - 3', reverse 5' - CTGCGGTGATGGCATCAG - 3'.

2.4. Методи статистичної обробки одержаних результатів

Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми Statistica 6.0 компанії «StatisticaInc.» (USA) з урахуванням характеру розподілу отриманих даних. З метою порівняння двох незалежних груп за кількісною ознакою використовували t-критерій Стюдента або U-критерій Манн-Уїтні. Аналіз спряженості ознак проводили з використанням методу Хі-квадрат. Для оцінки зв'язку експресії досліджених маркерів з клініко-патологічними характеристиками РМЗ проводили з використанням коефіцієнту Пірсона. Вживаність хворих аналізували за методом Каплана-Мейєра, достовірність між кривими – з використанням логарифмічного рангового тесту. 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.

РОЗДІЛ 3

ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ ЛАКТОФЕРИНУ В КЛІТИНАХ ЛІНІЙ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ

Розвиток онкології, молекулярної біології і генетики дав можливість враховувати молекулярно-генетичні індивідуальні особливості організму пацієнта при терапії злоякісних новоутворень. При цьому традиційним і поки незамінним інструментом досліджень в області біології раку, створення нових протипухлинних сполук і таргетних препаратів, а також розробки персоналізованих підходів діагностики, профілактики та лікування онкологічних захворювань є метод культури клітин і тканин *in vitro*. Як первинні клітини, так і панелі ліній клітин пухлин людини і тварин є унікальним об'єктом дослідження молекулярних і/або клітинних механізмів пухлинного росту і аналізу активності медикаментозних препаратів [124]. Саме тому метою першого етапу нашої роботи стало дослідження особливостей експресії ЛФ у клітинах ліній РМЗ різного ступеня злоякісності, а також вивчення зв'язку його рівня з цитоморфологічними та молекулярно-біологічними характеристиками клітин.

3.1. Особливості росту та цитоморфологічна характеристика клітинних ліній РМЗ людини різного ступеня злоякісності в системі *in vitro*

Аналіз цитоморфологічних особливостей досліджених ліній РМЗ дозволив встановити, що клітини різного ступеня злоякісності відрізняються варіабельністю ростових характеристик та цитоархітектоніки.

Найбільший час подвоєння кількості клітин (36 год) ідентифіковано у лінії T47D порівняно з аналогічними показниками у культурах MCF-7, MDA-MB-231 та MDA-MB-468 ($19 \pm 0,9$ год, $17 \pm 0,8$ год та $15 \pm 1,3$ год відповідно).

Клітини лінії T47D характеризуються рівномірним ростом з утворенням колоній, що мають чітко виражений контур. Найменший розмір таких колоній налічує 4-10 клітин (рис. 3.1. А). В центрі колонії мають правильну геометричну форму з нечітко вираженими виростами. При утворенні

моношару клітини стають менш розпластаними, колонії зливаються між собою. Клітини, які знаходяться на краю зони росту утворюють чіткі ряди клітин, більшість з яких циліндричної форми. Поодинокі клітини практично не зустрічаються. Ядро клітин лінії T47D має округлу форму і займає не більше 35 % об'єму клітин, в ньому чітко видно 1-4 ядерця (рис. 3.1. Б).

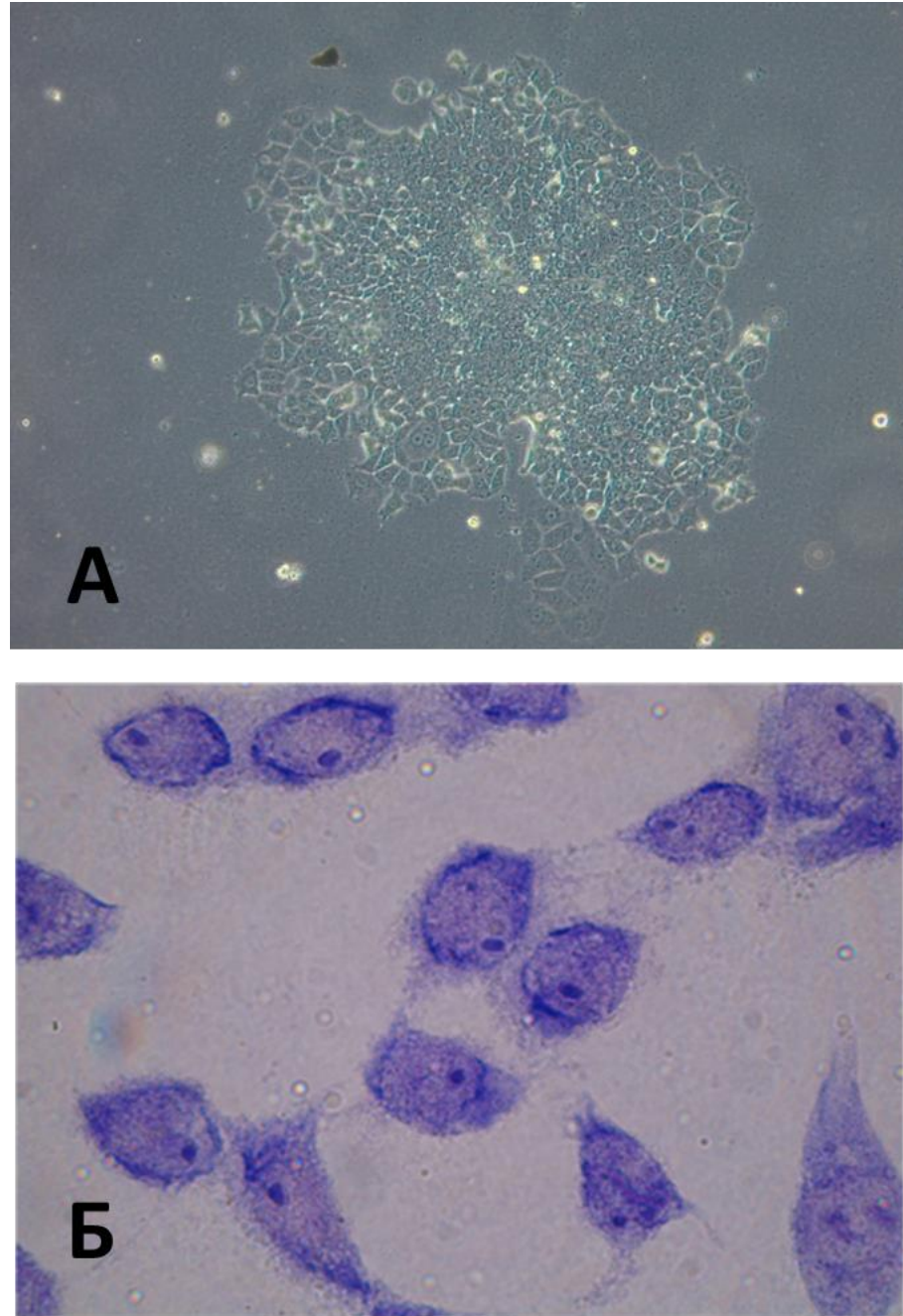


Рис. 3.1. Клітини РМЗ людини низького ступеня злоякісності лінії T47D: А - мікрофото живих клітин, $\times 400$; Б - зафарбовування за Романовським, $\times 1000$

Культура MCF-7 представлена крупними за розмірами клітинами

веретеноподібної форми з 2-5 виростами, які, по мірі росту, утворюють моношар (рис. 3.1.2 А). Клітини РМЗ лінії MCF-7 ростуть або відокремлено чи у поєднанні до трьох-семи, або у вигляді дещо більших скупчень. Чіткість контурів цитоплазми не завжди простежується, вона дуже світла пінчаста, з легким відтінком базofilії, не у всіх клітинах однакова за об'ємом (рис. 3.2. Б).

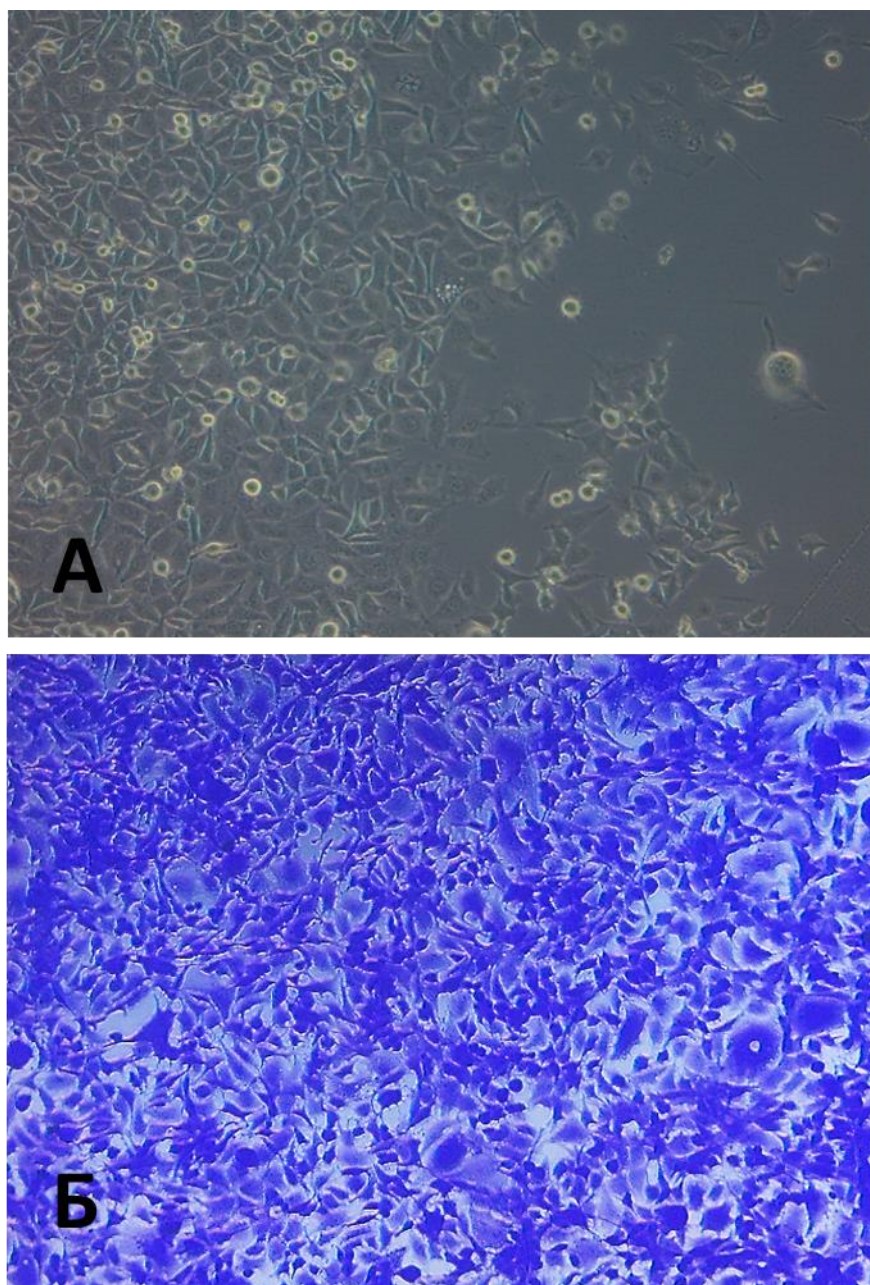


Рис. 3.2. Клітини РМЗ людини низького ступеня злоякісності лінії MCF-7: А - мікрофото живих клітин, $\times 400$; Б - зафарбовування за Романовським, $\times 400$

Клітини лінії MDA-MB-231 мають виражену веретеноподібну форму,

вони не утворюють щільного моношару, а ростуть колоніями (рис. 3.3. А). Клітини в центрі і по краях колоній мають ідентичну морфологію, цитоплазма утворює 2-4 вирости і по мірі наростання культури форма клітин видовжуються. У всіх ядрах визначається добре окреслені інтенсивні за забарвленням ядра. Кількість і розміри ядерця у клітинах варіюють. При досягненні 80% моношару клітини можуть змінювати свою морфологію і форму з веретеноподібної на округлу (рис. 3.3. Б).

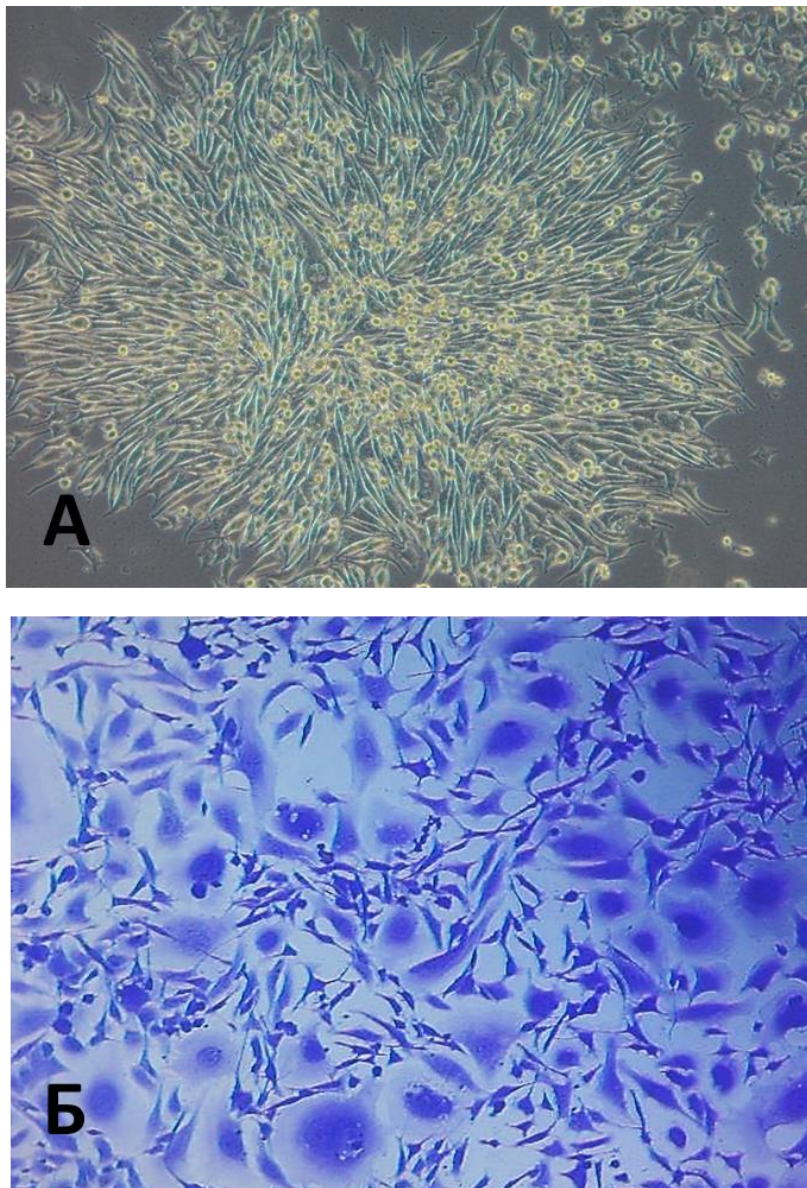


Рис. 3.3. Клітини РМЗ людини високого ступеня злоякісності лінії MDA-MB-231: А - мікрофото живих клітин, $\times 400$; Б - зафарбовування за Романовським, $\times 1000$

Клітини MDA-MB-468 утворюють колонії, які швидко розростаються.

Значна частина клітин в колоніях розташована більш щільно, менша — сегреговано по відношенню до тих, що лежать поруч з ними (рис. 3.4. А). На всіх етапах росту вони характеризуються невеликим розміром, високим ядерно-цитоплазматичним співвідношенням, Клітини мають округлу або видовжену форму з кількома виростами цитоплазми. Кількість і розміри ядер у клітинах варіюють. Хроматин має ніжну петлистозернисту текстуру. На фоні однотипної зернистості зустрічаються окремі, дещо більші за розмірами, глибки хроматину, нерівномірно розкидані по всій площі ядра (Рис. 3.4. Б).

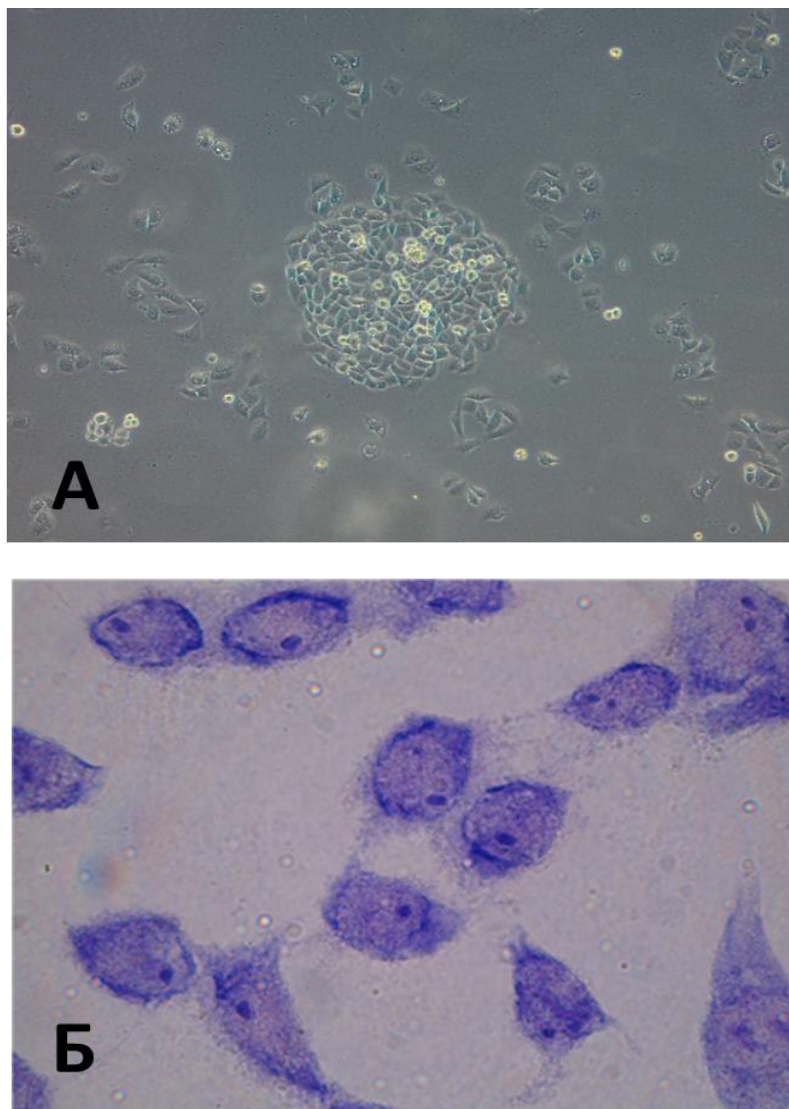


Рис. 3.4. Клітини РМЗ людини високого ступеня злоякісності лінії MDA-MB-468: А - мікрофото живих клітин, $\times 400$; Б - зафарбовування за Романовським, $\times 1000$

Таким чином, нами встановлено, що при однаковій гістологічній формі

PM3 (аденокарциноми) цитологічна характеристика та особливості росту клітин відрізняються значною гетерогенністю. Визначено, що досліджені клітинні лінії PM3 однакового ступеня злоякисності характеризуються варіабельністю цитологічних характеристик і типом росту, що вказує на необхідність подальших досліджень та ідентифікації молекулярно-біологічних маркерів, асоційованих зі ступенем злоякисності PM3.

3.2. Зв'язок експресії лактоферину з особливостями молекулярного профілю клітин PM3 різного ступеня злоякисності в системі *in vitro*

Наступним етапом нашої роботи було дослідження рівнів експресії ЛФ у клітинах ліній PM3 різного ступеня злоякисності. Імуноцитохімічне вивчення ЛФ у клітинах ліній PM3 свідчить про гетерогенність його експресії (рис. 3.5.).

Найбільші показники експресії ЛФ відзначено у клітинах високого ступеня злоякисності 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 балів H-score) встановлено в обох досліджених лініях PM3 низького ступеня злоякисності T47D та MCF-7 ($p < 0,05$) (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Експресія ЛФ в клітинах PM3 різного ступеня злоякисності

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

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

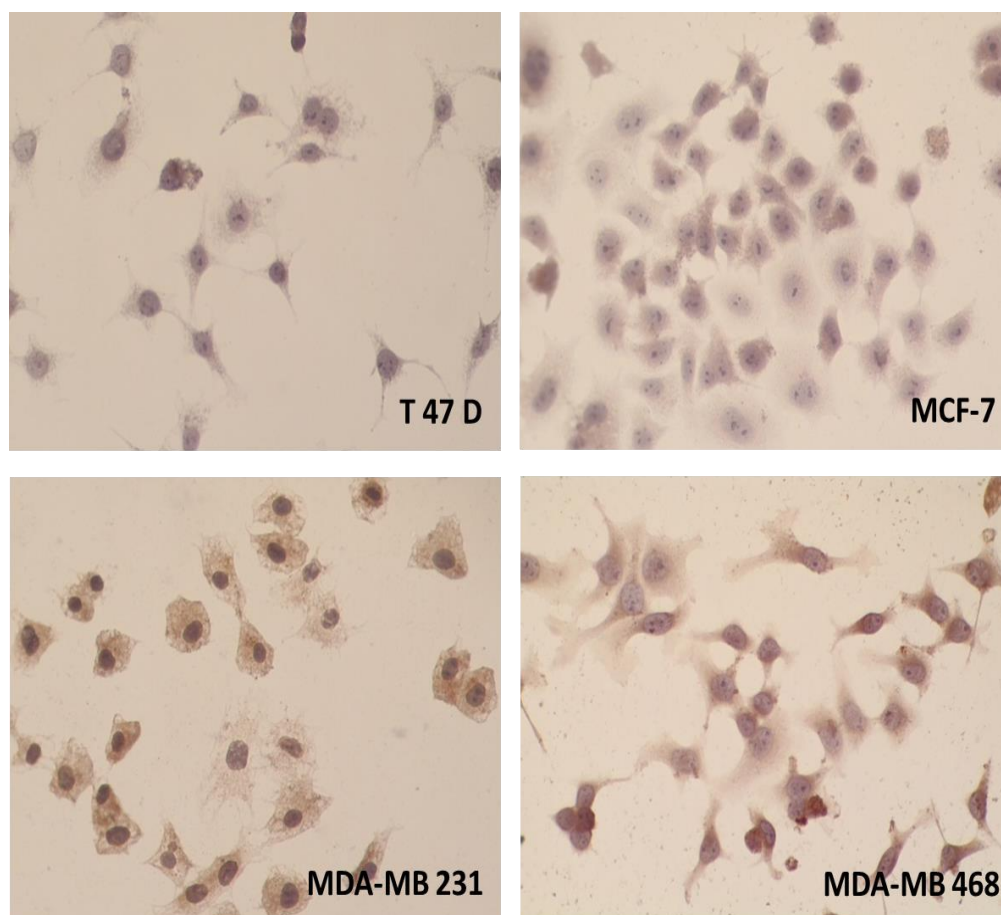


Рис. 3.5. Експресія ЛФ в клітинах ліній РМЗ різного ступеня злоякісності. Імуноцитохімія, дофарбовано гематоксиліном Майєра, $\times 400$.

Статистична обробка одержаних результатів показала, що експресія ЛФ у досліджених лініях РМЗ прямо корелює з показниками проліферативної та інвазивної активності клітин ($r=0,50$ та $r=0,39$ відповідно), а також обернено співвідноситься з їх рецепторним статусом ($r=-0,57$ та $r=-0,49$ для РЕ і РП відповідно) та адгезивними характеристиками ($r=-0,46$) (табл. 3.2).

Таблиця 3.2

Коефіцієнти кореляції між показниками експресії ЛФ 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	$p>0,05$

Підсумки. Дослідженнями в експериментальній системі *in vitro*

ідентифіковано цитоморфологічні ознаки та ростові характеристики клітин РМЗ різного ступеня злоякісності. Найбільший час подвоєння кількості клітин серед досліджених клітинних ліній ідентифіковано у лінії низького ступеня злоякісності Т47D, що відрізняється найменшою проліферативною активністю порівняно з аналогічними показниками у культурах MCF-7, MDA-MB-231 та MDA-MB-468. Визначено, що клітини обох досліджених ліній високого ступеня злоякісності мають виражену веретеноподібну форму, в процесі росту не утворюють щільного моношару, а утворюють колонії, що вірогідно обумовлено низькими адгезивними властивостями клітин MDA-MB-231 та MDA-MB-468.

Встановлено, 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 Т47D 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 РЕ ($r = -0,57$, $p < 0,05$), РП ($r = -0,49$; $p < 0,05$) і адгезивними властивостями клітин ($r = -0,46$; $p < 0,05$).

Отже, 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 та є підґрунтям для подальшого вивчення його показників у сироватці крові та пухлинах хворих на РМЗ.

Результати досліджень, викладені у Розділі 3, опубліковані у наступних роботах: [125].

РОЗДІЛ 4

ЗВ'ЯЗОК ПОКАЗНИКІВ ЛАКТОФЕРИНУ З КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

4.1. Дослідження показників ЛФ у сироватці крові 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.4.1.).

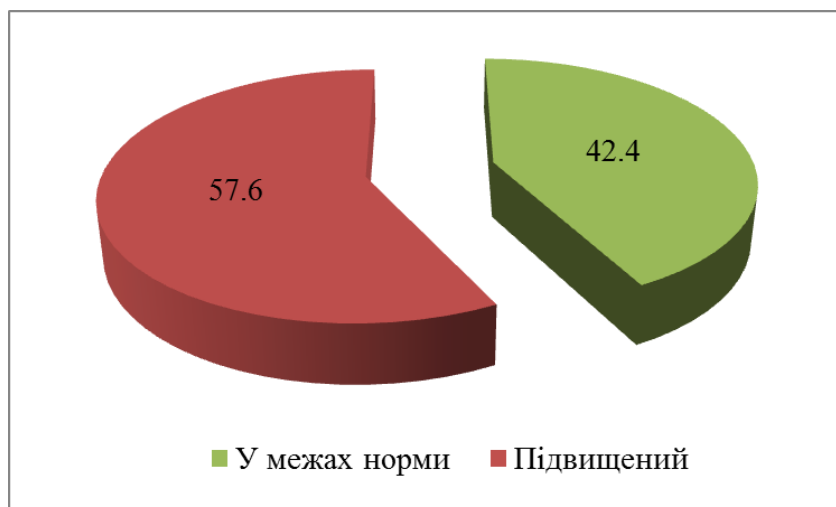


Рис. 4.1. Розподіл хворих на РМЗ з урахуванням показників ЛФ у сироватці крові

При аналізі зв'язку між показниками вмісту ЛФ у сироватці крові 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. 4.2.). 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).

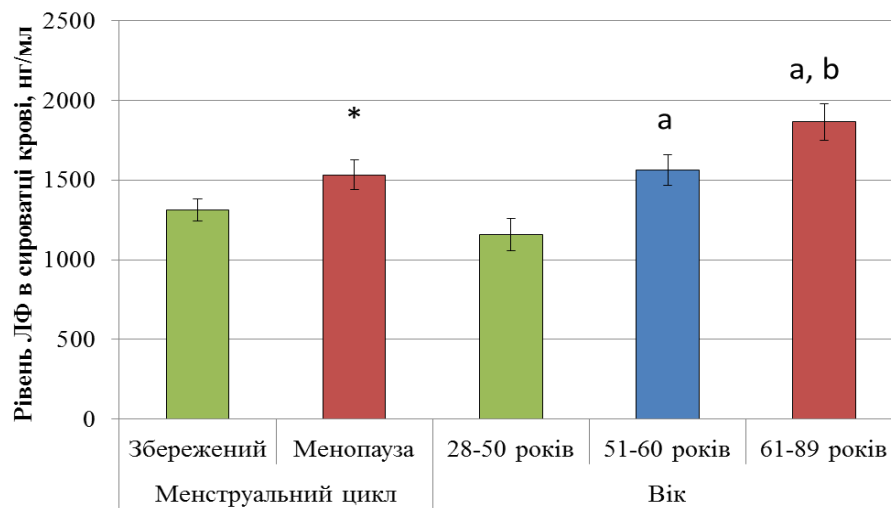


Рис. 4.2. Залежність рівня ЛФ в сироватці хворих на РМЗ від репродуктивного статусу та віку

Примітки:

* - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із збереженим менструальним циклом;

a - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ віком 28-50 років;

b - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ віком 51-80 років.

Стадія пухлинного процесу, а також наявність метастазів, як в регіонарних лімфатичних вузлах так і віддалених органах, є одними з ключових критеріїв, при виборі терапії РМЗ. Нами не виявлено достовірної різниці показників ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ залежно від стадії пухлинного процесу та наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (рис. 4.3.).

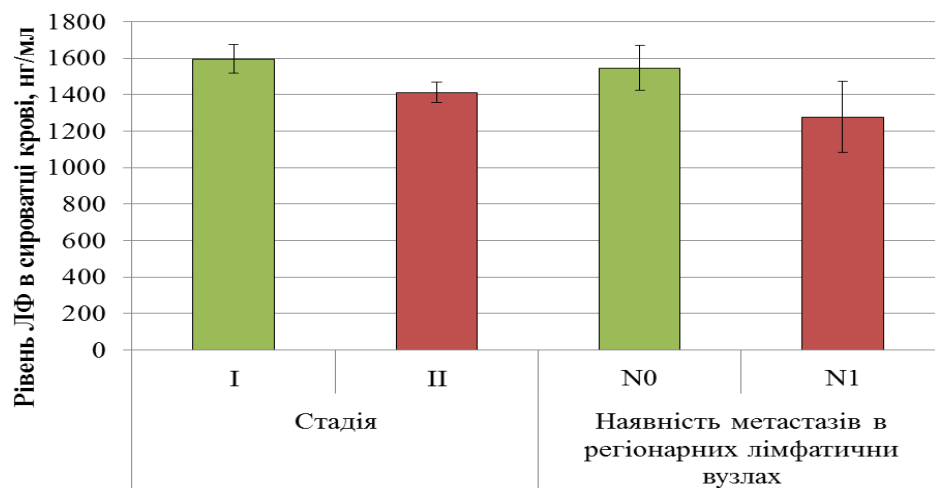


Рис. 4.3. Залежність рівнів ЛФ в сироватці крові від стадії РМЗ та наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів

Як відомо, агресивність пухлинного процесу залежать не тільки від стадії захворювання, а й від впливу різних клініко-морфологічних факторів, що дозволяють з високим ступенем ймовірності передбачувати характер або варіанти перебігу пухлинного процесу, його можливий результат, а також здійснювати індивідуалізоване планування комплексного лікування. Одним з найбільш значущих чинників прогнозування перебігу злоякісних новоутворень, в тому числі і РМЗ, вважають гістологічний тип пухлини. Аналіз частоти появи рецидивів захворювання в залежності від гістологічного типу пухлини показав, що вони найбільш часто діагностувалися у хворих з інфільтративним протоковим раком, чому відповідають низькі показники 5-річної безрецидивної виживаності порівняно з хворими, у яких були інші морфологічні типи новоутворень [126]. Оцінюючи рівень ЛФ у сироватці крові нами також встановлено, що його вміст був у 1,5 раза ($p < 0,05$) вищим у хворих на протоковий РМЗ порівняно з таким у хворих на дольковий РМЗ (рис. 4.1.4).

На перебіг і результат захворювання впливає ступінь диференціювання пухлинних новоутворень. Зокрема показано, що для хворих на низькодиференційований РМЗ характерними є більша кількість рецидивів та, відповідно, нижчі показники безрецидивної виживаності [126]. З огляду на це нами проведений аналіз рівнів ЛФ залежно від ступеня диференціювання РМЗ. Виявлено, що у хворих із низьким ступенем диференціювання РМЗ рівень сироваткового ЛФ був у 1,2 ($p < 0,05$) та 1,3 ($p < 0,05$) раза більшим порівняно з відповідними показниками пацієнтів із пухлинами помірного та високого ступеня диференціювання (рис. 4.4.).

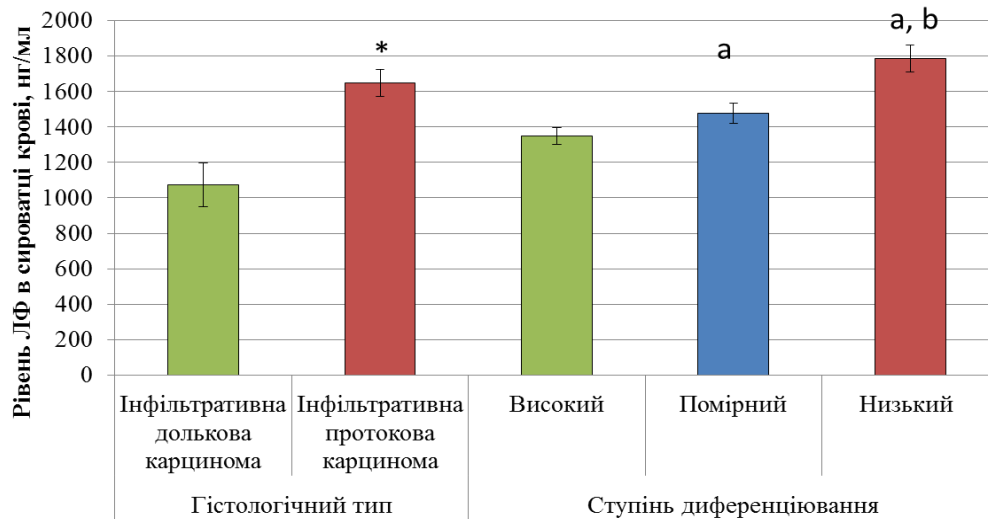


Рис.4.4. Залежність рівнів ЛФ в сироватці крові хворих від морфологічних особливостей та ступеня диференціювання РМЗ

Примітки:

* - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із інфільтративною дольковою карциномою;

^a - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із новоутвореннями високого ступеня диференціювання;

^b - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із новоутвореннями помірного ступеня диференціювання.

Згідно з вітчизняними та міжнародними рекомендаціями сьогодні при призначенні терапії, а також при прогнозуванні перебігу РМЗ використовують визначення молекулярно-генетичних підтипів пухлини, до яких відносяться люмінальний А, люмінальний Б, HER2-позитивний і тричі негативний або ж базальний підтипи. Доведено, що ці підтипи характеризуються різною відповіддю на терапію, диференційним перебігом та прогнозом захворювання [127-129].

У хворих із люмінальним А підтипом РМЗ показники ЛФ у сироватці крові становили $1078,7 \pm 77,1$ нг/мл і були у 1,3 ($p < 0,05$) та 2,0 ($p < 0,05$) рази меншими, ніж у хворих із люмінальним Б ($1388,5 \pm 62,1$ нг/мл) та базальним ($2161,5 \pm 90,4$ нг/мл) підтипом новоутворень (рси. 4.5.).

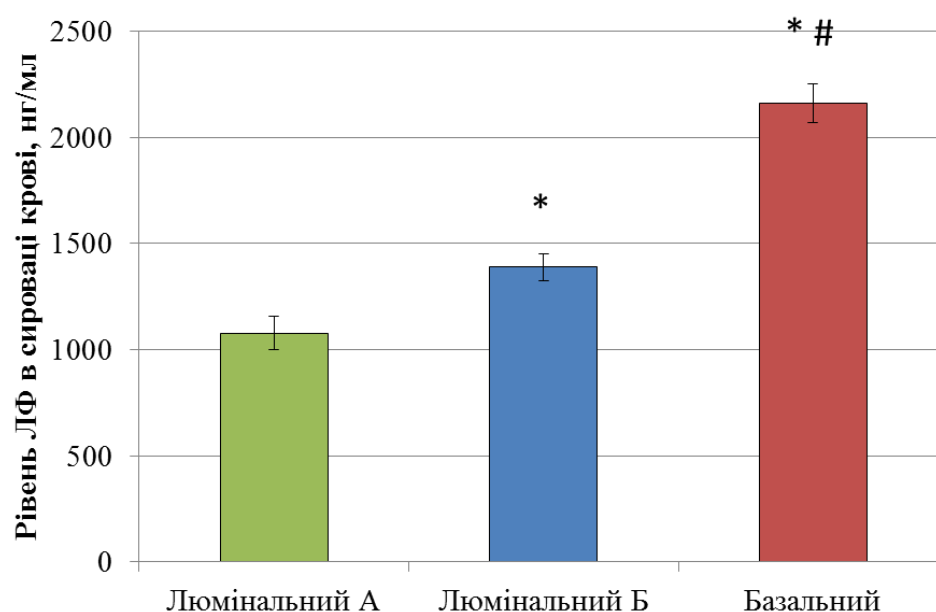


Рис.4.5. Рівень ЛФ в сироватці крові хворих на РМЗ залежно від молекулярного підтипу новоутворень

Примітки:

* - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із Люмінальним А підтипом;

- $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із Люмінальним Б підтипом.

Встановлені відмінності у показниках ЛФ у сироватці крові хворих із різними клініко-патологічними характеристиками РМЗ стали підґрунтям для проведення кореляційного аналізу, результати якого подані в табл. 4.1.

Таблиця 4.1

Зв'язок рівнів ЛФ у сироватці крові хворих з клініко-патологічними характеристиками РМЗ

Пари кореляцій		Значення коефіцієнту кореляції	
		r	p
Вік	Рівень ЛФ у сироватці крові	0,44	$p < 0,05$
Менструальна функція		-0,52	$p < 0,05$
Стадія		0,18	$p > 0,05$
Наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах		0,21	$p > 0,05$
Гістологічний підтип		0,49	$p < 0,05$
Ступінь диференціювання		- 0,54	$p < 0,05$
Молекулярний підтип		0,61	$p < 0,05$

Встановлено існування прямого кореляційного зв'язку між вмістом ЛФ в сироватці крові хворих на РМЗ та віком ($r=0,44$; $p<0,05$), гістологічним типом новоутворень ($r=0,49$; $p<0,05$) і молекулярним підтипом ($r=0,61$; $p<0,05$) новоутворень. Продемонстровано зворотну залежність між рівнем ЛФ в сироватці крові та менструальною функцією ($r=-0,52$; $p<0,05$) і ступенем диференціювання РМЗ ($r=-0,54$; $p<0,05$).

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

4.2. Особливості експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих на РМЗ

Молочна залоза є найбільшим ЛФ-синтезуючим органом у організмі жінки, тому природно, що саме вивчення його участі у процесах канцерогенезу цього органу викликає значний інтерес у дослідників. Так, численними дослідженнями показано протипухлинну активність екзогенного ЛФ. До ймовірних механізмів відносять регулювання активності природних кіллерів, модуляцію експресії білків клітинного циклу, інгібування VEGF-опосередкованого ангіогенезу, посилення апоптозу та ін. [130-132]. Незважаючи на існуючі дані в літературі роль ЛФ у розвитку РМЗ лишається остаточно не відомо.

Нами було проведено дослідження експресії ЛФ в пухлинній тканині РМЗ та фіброаденом молочної залози. Аналіз отриманих результатів показав, що пухлинна тканина хворих на РМЗ характеризувалась достовірно вищим рівнем експресії ЛФ у порівнянні з фіброаденомами молочної залози ($246,0\pm16,7$ та $134,6\pm15,2$ балів H-Score) (рис. 4.6.).

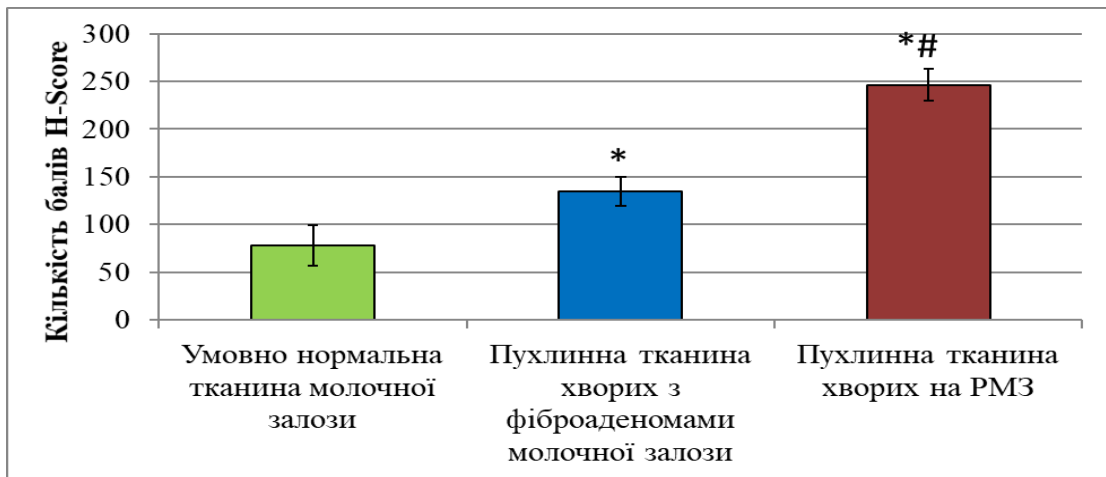


Рис. 4.6. Рівень експресії ЛФ у клітинах умовно нормальної та трансформованої тканині молочної залози

Примітки:

* - $p < 0,05$ у порівнянні з умовно нормальною тканиною молочної залози;

- $p < 0,05$ у порівнянні з тканиною фіброаденом молочної залози

Ген ЛФ активно експресується не тільки в клітинах молочної залози, але і в клітинах матки, в мієлоїдних клітинах (особливо в гранулоцитах) і клітинах мозку. У всіх перерахованих випадках його експресія чітко асоційована з лактацією, менструальними циклами і клітинним диференціюванням. З огляду на це було поставлено завдання проаналізувати залежність рівня експресії ЛФ від клініко-патологічних характеристик хворих на РМЗ.

При імуногістохімічному визначенні ЛФ у цитоплазмі пухлин хворих на РМЗ (Рис. 4.7., 4.8.) спостерігалась позитивна реакція з моноклональними антитілами специфічними до цього білка. Аналіз отриманих результатів показав, що частота пухлин із позитивною детекцією продукту реакції становила 79,0%. Високий, середній та низький рівень експресії досліджуваного маркера ідентифіковано у цитоплазмі клітин 40%, 27% та 12% випадків, відповідно, серед всієї когорти досліджених хворих на РМЗ (рис. 4.8.). Зазначимо, що відсутність експресії ЛФ виявлено у 21 % випадків.

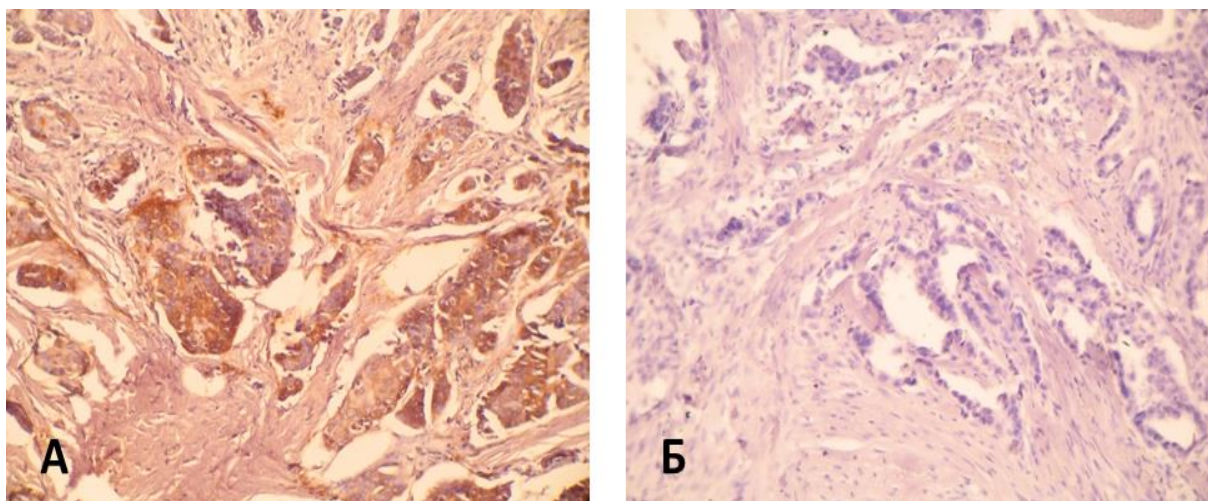


Рис. 4.7. Наявність (А) та відсутність (Б) експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих на РМЗ, імуногістохімічний метод, дофарбування гематоксиліном Майєра, $\times 400$; В - розподіл хворих на РМЗ з урахуванням показників ЛФ у пухлинній тканині

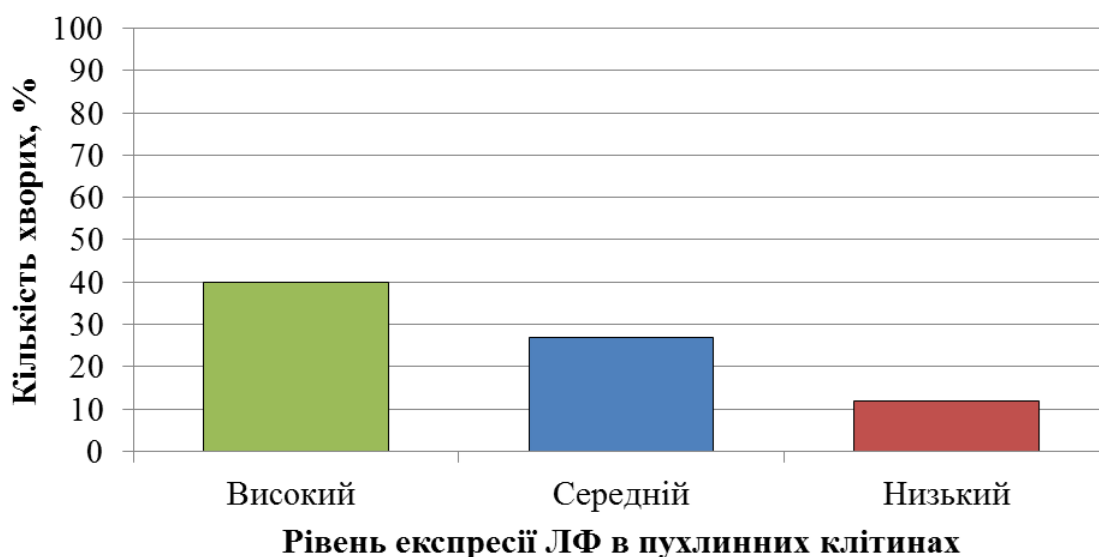


Рис. 4.8. Розподіл хворих на РМЗ з урахуванням показників ЛФ у пухлинній тканині

При аналізі показників експресії ЛФ у пухлинних клітинах не визначено зв'язку між експресією ЛФ у пухлинних клітинах залежно від віку хворих на РМЗ. Зокрема, нами не виявлено достовірної різниці як рівнів експресії ЛФ (рис. 4.9. А), так і кількості ЛФ-позитивних новоутворень у хворих на РМЗ різного віку (Рис. 4.8. Б).

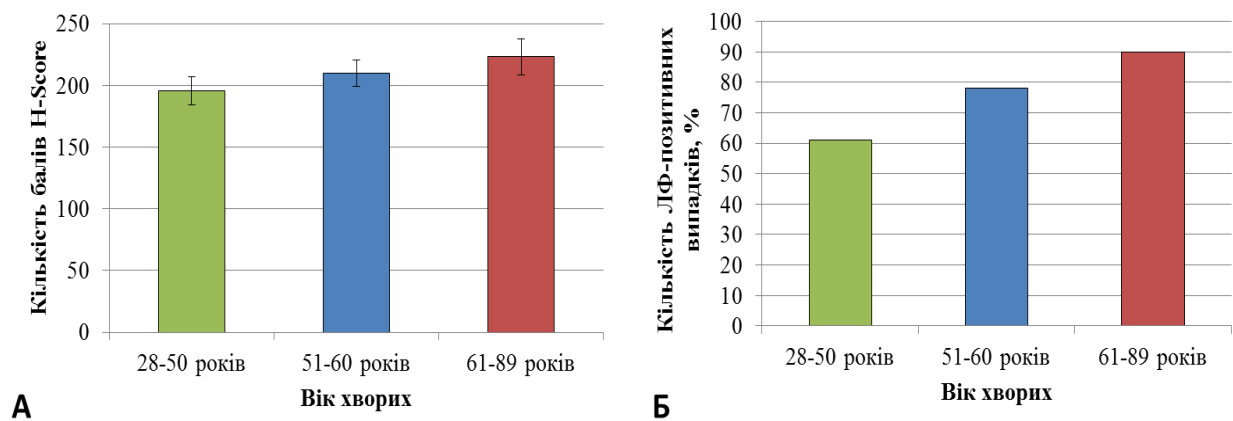


Рис. 4.9. Залежність показників експресії ЛФ у пухлинних клітинах від віку хворих на РМЗ

Дослідження зв'язку між показниками експресії ЛФ та статусом менструальної функції продемонструвало на 18 % вищі рівні цього глікопротеїну в пухлинній тканині хворих із менопаузою (Рис. 4.10. (А)). Виявлено достовірно меншу кількість пухлин, позитивних за експресією досліджуваного маркера, у хворих зі збереженою менструальною функцією (64% хворих), порівняно із пацієнтами, що знаходились у менопаузі – 82% хворих (рис. 4.10. (Б)).

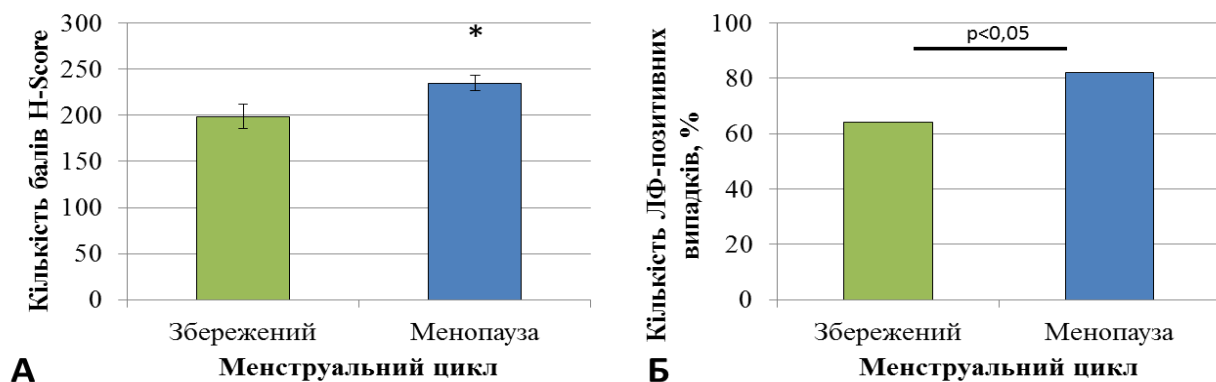


Рис. 4.10. Залежність рівня експресії ЛФ у пухлинних клітинах від менструальної функції хворих на РМЗ

Примітка: * - $p < 0,05$ у порівнянні із хворими зі збереженою менструальною функцією

Детальний аналіз отриманих результатів не виявив достовірної залежності показників експресії ЛФ в пухлинній тканині від стадії РМЗ (табл. 4.2). Зокрема, рівні експресії ЛФ у хворих I та II стадії були однаковими і

становили $242,5 \pm 13,0$ та $252 \pm 19,5$ балів H-Score, відповідно. При цьому кількість ЛФ-позитивних пухлин у хворих I стадії дорівнювала 83,0 % і була всього на 6,0 % вищою порівняно із пацієнтами із II стадією пухлинного процесу. Нами також не виявлено достовірної різниці показників ЛФ у пухлинній тканині хворих на РМЗ залежно від наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів.

Таблиця 4.2

Показники експресії ЛФ у пухлинних клітинах залежно від стадії РМЗ та наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів

Характеристики	Рівень експресії в пухлинній тканині (бали H-Score)	Кількість хворих із ЛФ-позитивними пухлинами (n/%)
Стадія РМЗ за TNM (категорія T)		
I	$242,5 \pm 13,0$	39/83,0
II	$252,0 \pm 19,5$	79/76,0
Метастази у регіонарні лімфатичні вузли (категорія N)		
N0	$236,2 \pm 12,6$	77/74,8
N1	$252,0 \pm 10,7$	35/83,3
Nx	$231,0 \pm 14,5$	6/100

Порівняння експресії ЛФ у пухлинах з різним гістологічним типом РМЗ показало, що у клітинах інфільтруючих протокових карцином рівень цього протеїну був на 15 % ($p < 0,05$) більшим ($246,0 \pm 11,0$ балів H-Score) порівняно із інфільтруючими дольковими новоутвореннями ($214,0 \pm 13,0$ балів H-Score) (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Показники пухлинного ЛФ залежно від гістологічних особливостей РМЗ

Характеристики	Рівень експресії в пухлинній тканині (бали H-Score)	Кількість хворих із ЛФ-позитивними пухлинами (n/%)
Інфільтративний протоковий рак	$246,3 \pm 11,0$	92/91,1
Інфільтративний дольковий рак	$214,0 \pm 13,0^1$	36/72,0 ¹

Примітки:

¹ - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на інфільтративний протоковий РМЗ

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження дозволив встановити найбільшу частоту ЛФ-позитивних новоутворень у хворих із протоковим РМЗ – 91,1% ніж у пацієнтів із дольковим РМЗ – 72,0% відповідно ($p<0,05$).

У пацієнтів з карциномами низького ступеня диференціювання середній рівень експресії ЛФ становив $264,0\pm10,2$ балів H-Score, що достовірно вище у порівнянні із групами хворих з помірним ($182,3\pm8,4$ балів H-Score) та високим ($143,5\pm10,5$ балів H-Score) ступенем диференціювання (табл. 4.4).

Таблиця 4.4

Показники пухлинного ЛФ залежно від ступеня диференціювання РМЗ

Характеристики	Рівень експресії в пухлинній тканині (бали H-Score)	Кількість хворих із ЛФ-позитивними пухлинами (n/%)
G1 (високий)	$143,5\pm10,5$	29/69,0
G2 (помірний)	$182,3\pm8,4^1$	62/79,0 ¹
G3 (низький)	$264,5\pm10,5^{1,2}$	28/90,32 ^{1,2}

Примітки:

¹ - $p<0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих із новоутвореннями високого ступеня диференціювання;

² - $p<0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих із новоутвореннями помірного ступеня диференціювання

Зазначимо, що кількість хворих із низькодиференційованими новоутвореннями, які були позитивні за експресією ЛФ, становила 90,3 %, що на 11,0 % та 21,0 % більше відповідної кількості пацієнтів із ЛФ-позитивними помірно- та вискодиференційованими 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).

Зіставлення отриманих даних щодо експресії ЛФ у пухлинних клітинах хворих на РМЗ з різним молекулярним фенотипом свідчить про те, що високі показники експресії цього глікопротеїну асоційовані з базальним

молекулярним підтипом новоутворень. Зокрема рівень експресії ЛФ у пухлинній тканині хворих із базальним молекулярним підтипом становив $254,0 \pm 9,7$ балів H-Score і був на 21,0 % ($p < 0,05$) та 43,0 % ($p < 0,05$) більшим порівняно з відповідними показниками пацієнтів із новоутвореннями з люмінальним А та Б та підтипами відповідно (рис. 4.11.). 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 пацієнтами із базальним молекулярним підтипом новоутворень – 97,1 % ($p < 0,05$). Слід відзначити, що пухлини базального молекулярного підтипу РМЗ характеризувалися лише високим рівнем експресії ЛФ (>200 балів).

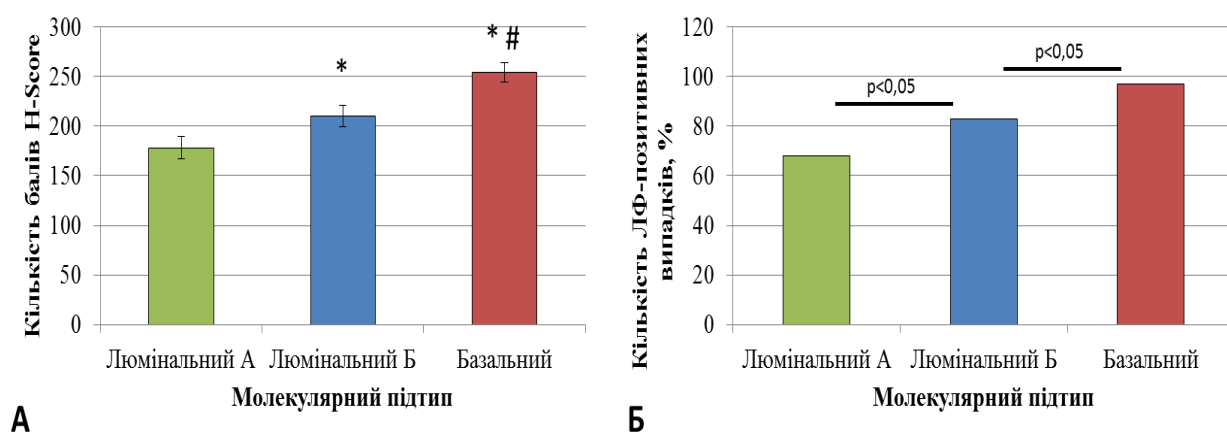


Рис. 4.11. Залежність рівня експресії ЛФ у пухлинних клітинах хворих на РМЗ від молекулярного підтипу новоутворень.

Примітки:

* - $p < 0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РМЗ люмінального А підтипу;

- $p < 0,05$ у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РМЗ люмінального Б підтипу.

Встановлені відмінності у показниках ЛФ у пухлинній тканині хворих із різними клініко-патологічними характеристиками РМЗ стали підґрунтям для проведення кореляційного аналізу, результати якого подані в табл. 4.5.

Зв'язок показників експресії ЛФ в пухлинній тканині з клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ

Пари кореляцій		Значення коефіцієнту кореляції	
		r	p
Вік	Рівень експресії ЛФ у пухлинній тканині	0,39	p<0,05
Менструальна функція		0,06	p>0,05
Стадія		0,14	p>0,05
Наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах		0,23	p>0,05
Гістологічний підтип		0,57	p<0,05
Ступінь диференціювання		-0,62	p<0,05
Молекулярний підтип		0,59	p<0,05

Встановлено існування прямого кореляційного зв'язку між рівнем експресії ЛФ в пухлинній тканині хворих на РМЗ та віком пацієнтів ($r=0,39$; $p<0,05$), гістологічним типом ($r=0,57$; $p<0,05$) і молекулярним підтипом новоутворень ($r=0,59$; $p<0,05$). Визначено зворотну залежність між показниками експресії ЛФ та ступенем диференціювання РМЗ ($r=-0,57$; $p<0,05$).

Підсумки. Встановлено, що рівень ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ достовірно перевищує максимальні референтні значення у 57,6% випадках. Найвищі показники вмісту ЛФ у сироватці крові визначено 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 $r = -0,61$; $p<0,05$).

Частота пухлин із позитивною детекцією ЛФ у пухлинних клітинах дорівнювала 79,0%. Найбільшу кількість ЛФ-позитивних пухлин зафіксовано при інфільтративному протоковому РМЗ (91,1 %, $p<0,05$), у новоутвореннях низького ступеня диференціювання (90,3 % випадків, $p<0,05$) та у пухлинах базального молекулярного підтипу (97,1% випадків, $p<0,05$). Середній рівень експресії ЛФ (100-200 балів) ідентифіковано 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).

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.

Отримані дані розширюють існуючі уявлення щодо асоціації порушень метаболізму залізоzv'язуючих білків в пухлинних клітинах та організмі хворих зі ступенем злоякісності РМЗ та є підтвердженням участі ЛФ у патогенезі цієї нозологічної форми раку.

Результати досліджень, викладені у Розділі 4, опубліковані у наступних роботах: [133-142].

РОЗДІЛ 5

ЗВ'ЯЗОК ЛАКТОФЕРИНУ З МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ НОВОУТВОРЕНЬ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

5.1. Особливості експресії пухлинної та циркулюючої мікроРНК-214, що бере участь у регуляції експресії ЛФ, у хворих на РМЗ

Активація гена ЛФ транскрипційними факторами має комплексний характер, а кінцевий її ефект залежить від співвідношення концентрацій стимулюючих і супресуючих факторів. Організація енхансер-промоторної ділянки гена ЛФ забезпечує можливість диференціальної активації його експресії за посередництвом різноманітних регуляторних каскадів у клітинах клітинах різного гістогенезу [143]. Встановлено, що на експресію ЛФ у клітинах молочної залози може впливати безліч факторів, таких як ядерні рецептори, фактори транскрипції, пролактин, естроген, епідермальний фактор росту, імунні комплекси IgA та ретиноева кислота [144]. Останнім часом важливу роль в регуляції експресії ЛФ відводять епігенетичним механізмам, в тому числі порушенням метилювання ДНК, а також мікроРНК.

З метою виявлення епігенетичних порушень регуляції експресії ЛФ було проведено вивчення особливостей експресії мікроРНК-214 у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ. 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) (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Рівень експресії циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 залежно від віку та менструальної функції хворих на РМЗ

Характеристики	Рівень мікроРНК-214, у.о.	
	Рівень експресії мікроРНК-214 у сироватці крові	Рівень експресії мікроРНК-214 у пухлинній тканині
Вік		
28-50 років	7,7±0,3	8,4±0,4
51-60 років	5,2±0,4 ¹	5,3±0,2 ¹
61-89 років	3,6±0,4 ^{1,2}	3,4±0,3 ^{1,2}
Менструальний цикл		
Збережений	8,0±0,5	8,7±0,2
Менопауза	6,5±0,4 ³	3,1±0,3 ³

Примітки:

¹ - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ віком 28-50 років;

² - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ віком 51-80 років;

³ - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із збереженим менструальним циклом.

Встановлено, що рівень мікроРНК-214 в сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ І стадії становив 4,9±0,4 та 8,0±0,5 у.о. та достовірно не відрізнявся від аналогічних показників пацієнтів із II стадією пухлинного процесу - 5,3±0,7 та 7,7±0,4 у.о. Достовірної різниці рівнів експресії мікроРНК-214 залежно від статусу регіонарних лімфатичних вузлів також не виявлено (табл. 5.2).

Таблиця 5.2

Рівень експресії циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 залежно від стадії РМЗ та метастатичного ураження РЛВ

Характеристики	Рівень мікроРНК-214, у.о.	
	Рівень експресії мікроРНК-214 у сироватці крові	Рівень експресії мікроРНК-214 у пухлинній тканині
Стадія РМЗ за TNM (категорія T)		
I	4,9±0,4	8,0±0,5
II	5,3±0,7	7,7±0,4
Метастази у регіонарні лімфатичні вузли (категорія N)		
N0	5,1±0,4	7,5±0,3
N1	4,7±0,8	7,4±0,6
Nx	-	8,0±0,4

Аналіз показників експресії пухлино-асоційованої мікроРНК-214 залежно від гістологічного типу злоякісних новоутворень виявив її достовірно вищі показники (в 1,2 раза; $p < 0,05$) у хворих із інфільтративним дольковим раком (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Рівень експресії циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 залежно від гістологічних особливостей РМЗ

Характеристики	Рівень мікроРНК-214, у.о.	
	Рівень експресії мікроРНК-214 у сироватці крові	Рівень експресії мікроРНК-214 у пухлинній тканині
Інфільтративний протоковий рак	4,2±0,2	5,2±0,3
Інфільтративний дольковий рак	4,5±0,4	6,0±0,4 ¹

Примітки: ¹ - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із інфільтративною дольковою карциномою; ² - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із новоутвореннями високого ступеня диференціювання; ³ - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із новоутвореннями помірного ступеня диференціювання.

Рівні експресії циркулюючої та пухлинно-асоційованої мікроРНК-214 також були достовірно більшими ніж у пацієнтів із новоутвореннями помірного (5,6±0,3 та 6,4±0,1 у.о.) та низького ступеня диференціювання (3,4±0,2 та 4,2±0,3 у.о.) (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Рівень експресії циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 залежно від гістологічних особливостей та ступеня диференціювання РМЗ

Характеристики	Рівень мікроРНК-214, у.о.	
	Рівень експресії мікроРНК-214 у сироватці крові	Рівень експресії мікроРНК-214 у пухлинній тканині
G1 (високий)	7,2±0,4	8,2±0,3
G2 (помірний)	5,6±0,3 ¹	6,4±0,1 ¹
G3 (низький)	3,4±0,2 ^{1,2}	4,2±0,3 ^{1,2}

Примітки: ¹ - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із новоутвореннями високого ступеня диференціювання; ² - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із новоутвореннями помірного ступеня диференціювання.

Встановлено, що у хворих із люмінальним А підтипом РМЗ рівень мікроРНК-214 як в сироватці крові, так і пухлинній тканині був достовірно вищим ($7,5 \pm 0,5$ 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 підтипом пухлин, у яких ці показники становили $2,9 \pm 0,4$ та $3,4 \pm 0,2$ у.о відповідно (рис. 5.1.).

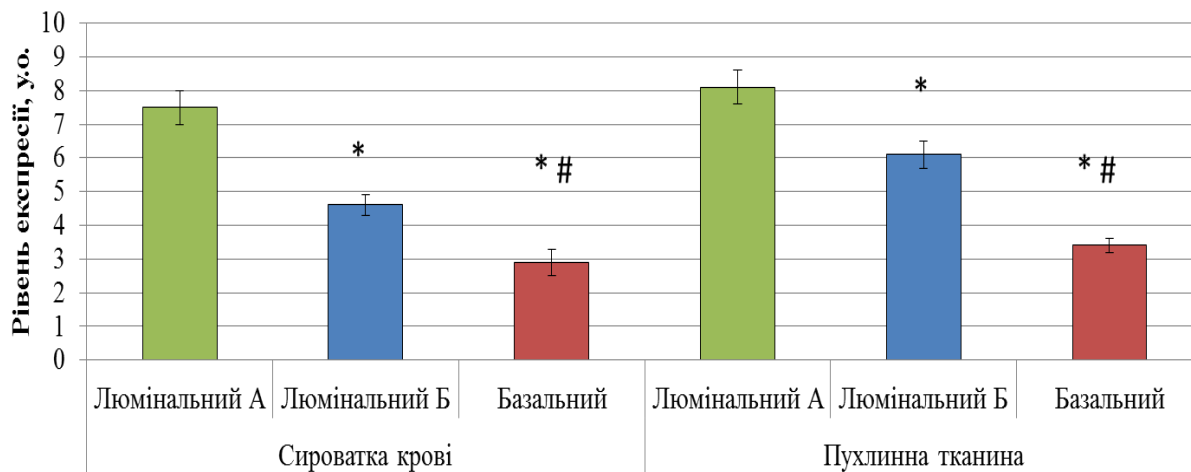


Рис.5.1. Рівні експресії мікроРНК-214 в сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ залежно від молекулярного підтипу новоутворень

Примітки:

* - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із Люмінальним А підтипом;

- $p < 0,05$ у порівнянні з показниками хворих на РМЗ із Люмінальним Б підтипом.

Аналіз зв'язку показників циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 із клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ дозволив визначити деякі достовірні кореляції.

Як видно з даних, не визначено достовірних кореляційних зв'язків експресії циркулюючої (табл. 5.6) та пухлинної (табл. 5.6) мікроРНК-214 зі стадією пухлинного процесу та наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів.

Таблиця 5.5

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

Пари кореляцій		r	p
Вік	Рівень експресії мікроРНК-214 в сироватці крові	-0,57	p<0,05
Репродуктивна функція		-0,56	p<0,05
Стадія		0,13	p>0,05
Наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах		0,27	p>0,05
Гістологічний підтип		- 0,50	p<0,05
Ступінь диференціювання		0,67	p<0,05
Молекулярний підтип		- 0,58	p<0,05

Таблиця 5.6

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

Пари кореляцій		r	p
Вік	Рівень експресії мікроРНК-214 в пухлинній тканині	-0,44	p<0,05
Репродуктивна функція		-0,49	p<0,05
Стадія		0,18	p>0,05
Наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах		0,23	p>0,05
Гістологічний підтип		- 0,57	p<0,05
Ступінь диференціювання		0,59	p<0,05
Молекулярний підтип		-0,61	p<0,05

Натомість встановлено, що рівень експресії мікроРНК-214 як в пухлинній тканині так і сироватці крові прямо корелює зі ступенем диференціювання новоутворень ($r=0,67$ та $r=0,59$). Доведено існування оберненої залежності між експресією мікроРНК-214 та віком і репродуктивною функцією хворих, а також гістологічним типом та молекулярним підтипом РМЗ.

5.2. 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 (рис. 5.2. та рис. 5.3.).

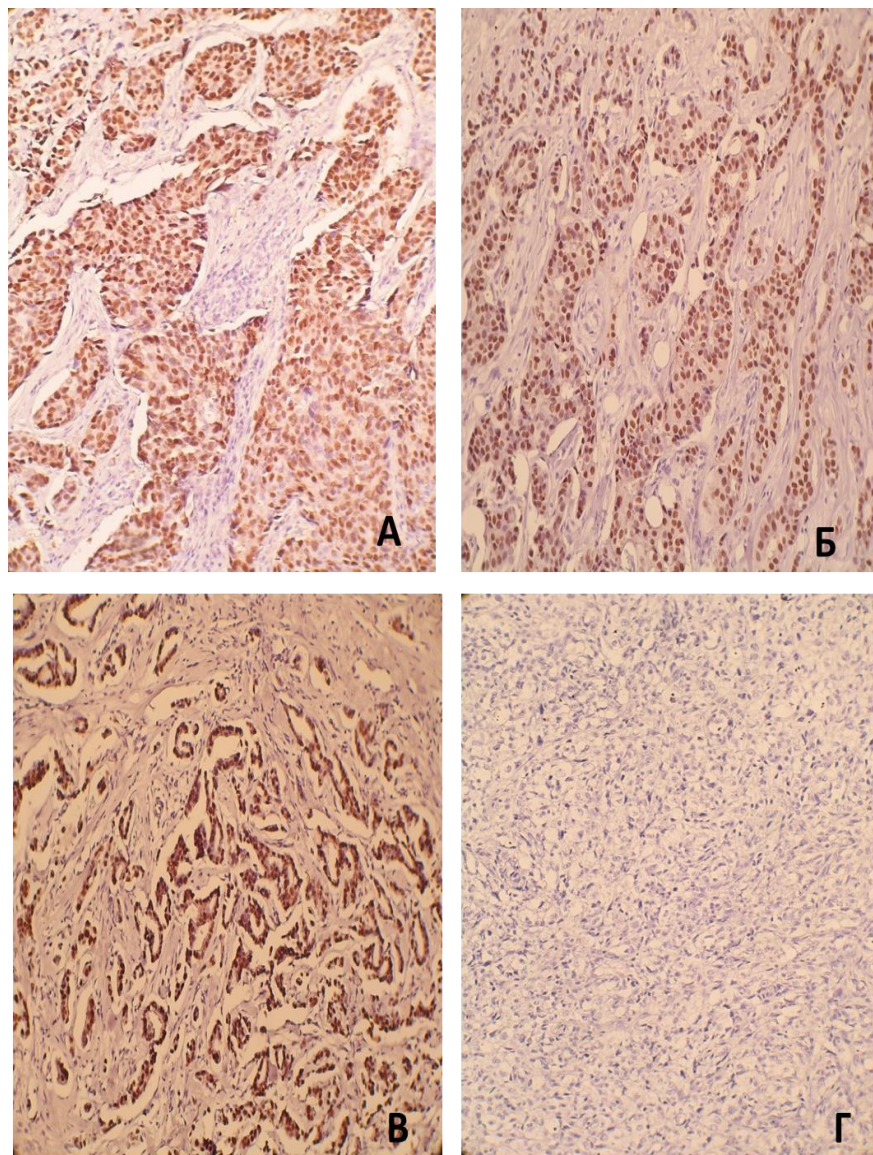


Рис. 5.2. Експресія рецепторів стероїдних гормонів в пухлинній тканині хворих на РМЗ: А - наявність експресії РЕ, $\times 400$; Б - наявність експресії РП, $\times 400$; В - наявність експресії РЕ, $\times 200$; Г - відсутність експресії РП, $\times 200$. Імуногістохімія, хромоген ДАБ. Дофарбування гематоксиліном Майєра.

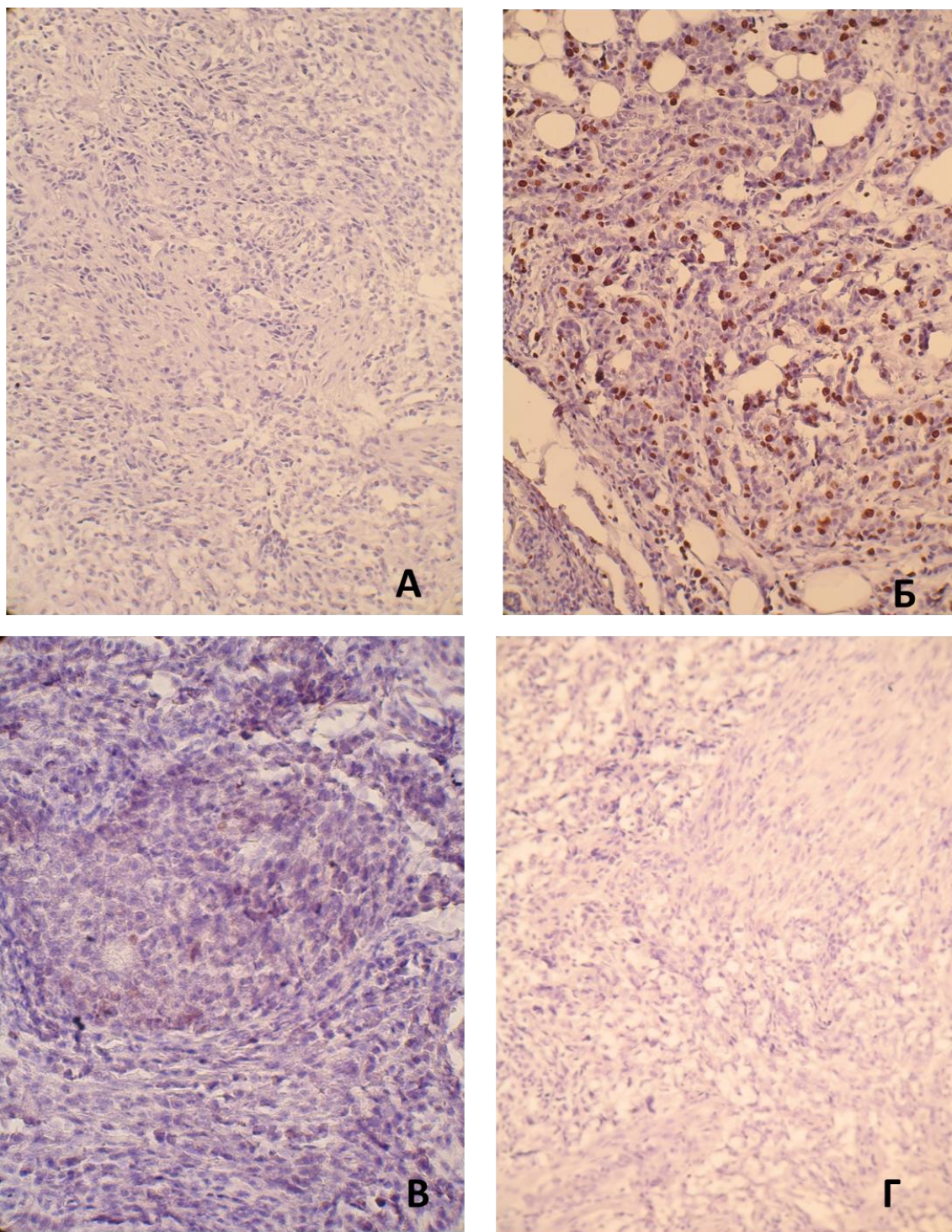


Рис. 5.3. Експресія рецепторів стероїдних гормонів в пухлинній тканині хворих на РМЗ: А - наявність експресії РЕ, $\times 200$; Б - наявність експресії РП, $\times 400$; В - відсутність експресії РЕ, $\times 400$; Г - відсутність експресії РП, $\times 200$. Імуногістохімія, хромоген ДАБ. Дофарбування гематоксиліном Майєра.

Як видно з даних, наведених на рис.5.4.,5.5. 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) у

пухлинних клітинах ($2254,3 \pm 82,6$ проти $1156,6 \pm 78,0$ нг/мл, $p < 0,05$).

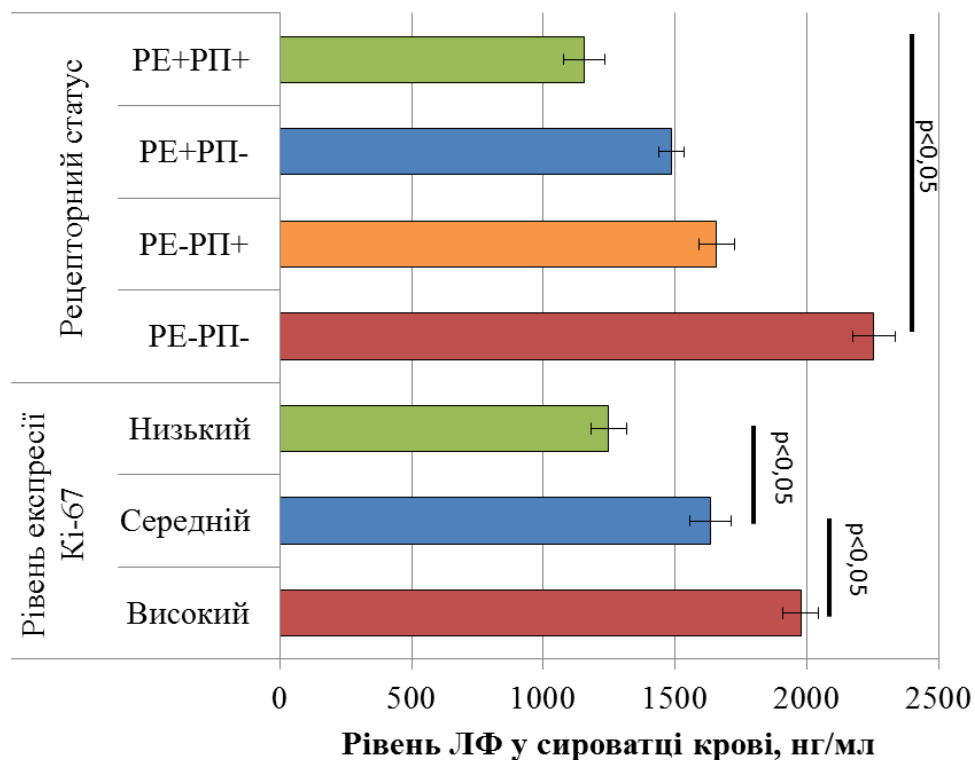


Рис. 5.4. Рівень ЛФ у сироватці крові залежно від рецепторного статусу та проліферативної активності новоутворень

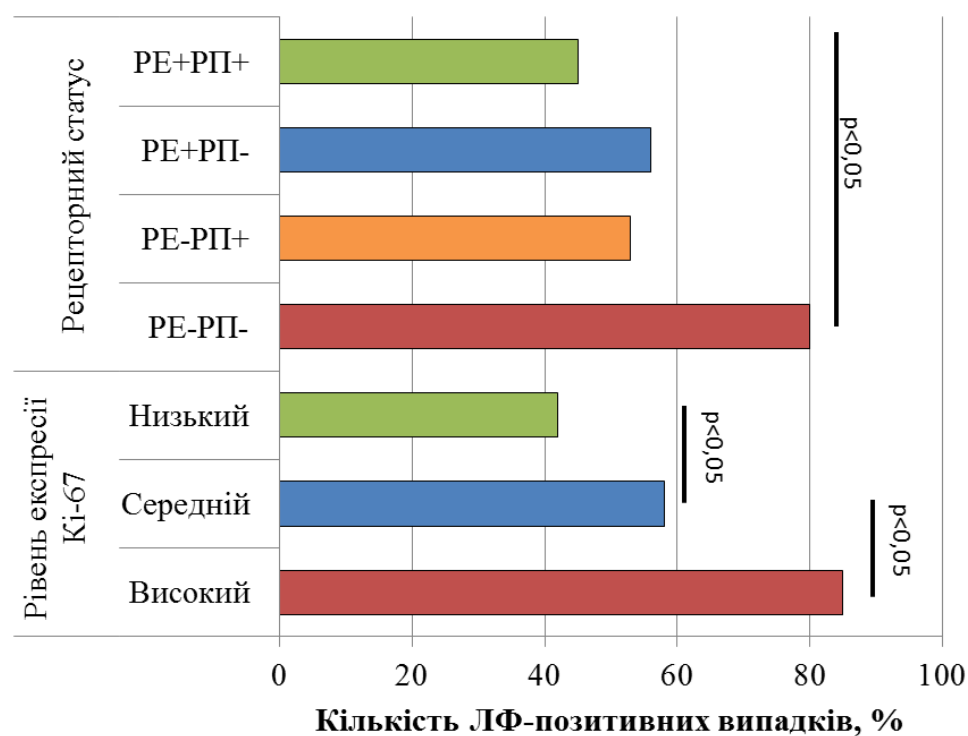


Рис. 5.5. Наявність експресії ЛФ у пухлинній тканині хворих на РМЗ залежно від рецепторного статусу та проліферативної активності новоутворень

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. 5.4.).

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. 5.5.).

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⁻, RP⁻) та високою експресією Ki-67 (рис. 5.4., 5.5., 5.6.).

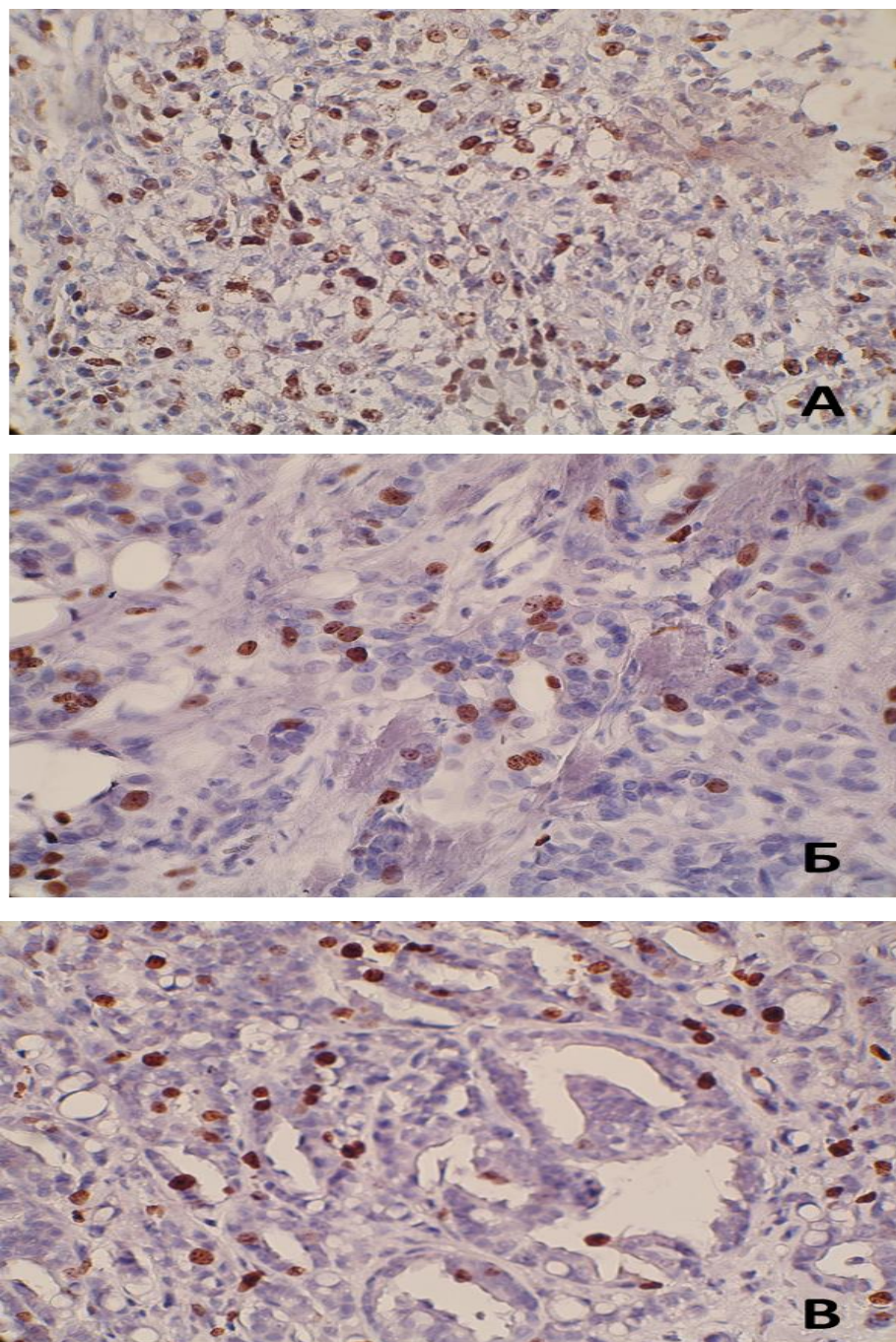


Рис. 5.6. Експресія Ki-67 в пухлинній тканині хворих на РМЗ: А - високий; Б - помірний, В - низький рівень експресії. Імуногістохімія, хромоген ДАБ. Дофарбування гематоксиліном Майєра, $\times 400$.

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 РЕ і РП, а також проліферативною активністю новоутворень, було проаналізовано загальну виживаність хворих на РМЗ з урахуванням показників експресії зазначених маркерів. Як видно з наведених на рис.5.7. даних, достовірне зниження показників 5-річної загальної виживаності на 16,9 %, встановлено у хворих, пухлинні клітини яких експресують ЛФ, мають негативний статус експресії РЕ, РП та високий проліферативний потенціал (експресія Ki-67 у понад 50,0 % пухлинних клітин), ніж у хворих із молекулярним профілем пухлини ЛФ+, РЕ-, РП- та низьким проліферативним потенціалом (експресія Ki-67 у менш ніж 50,0 % 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.

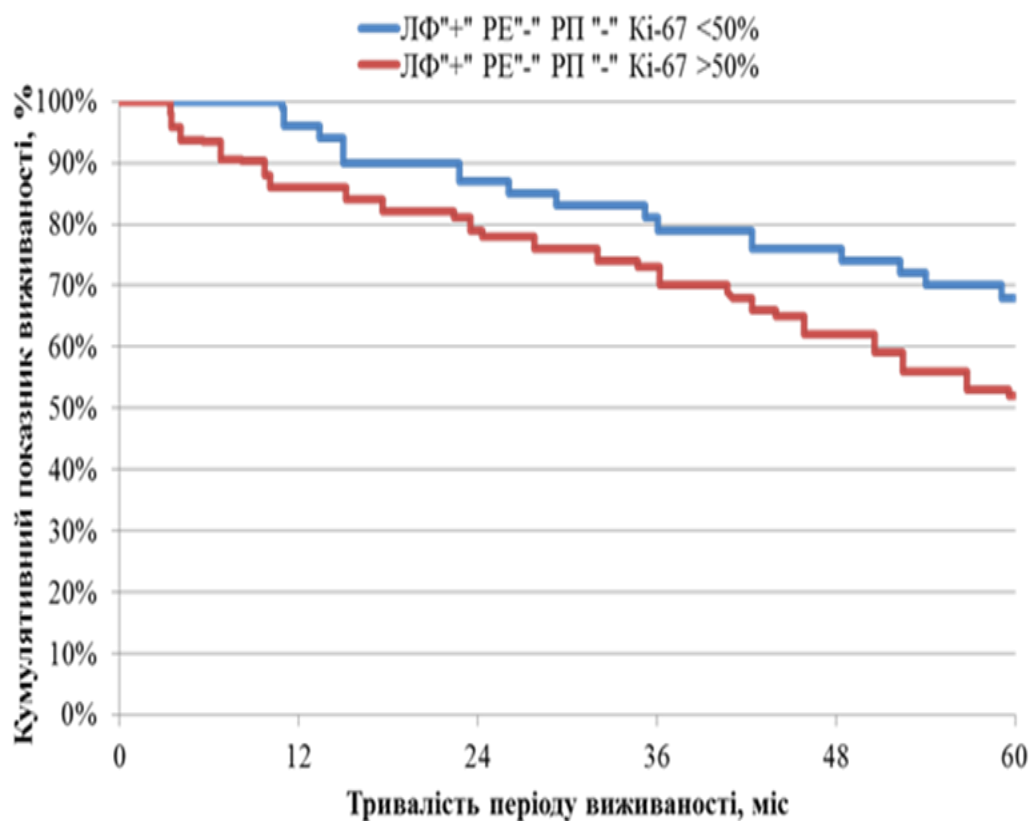
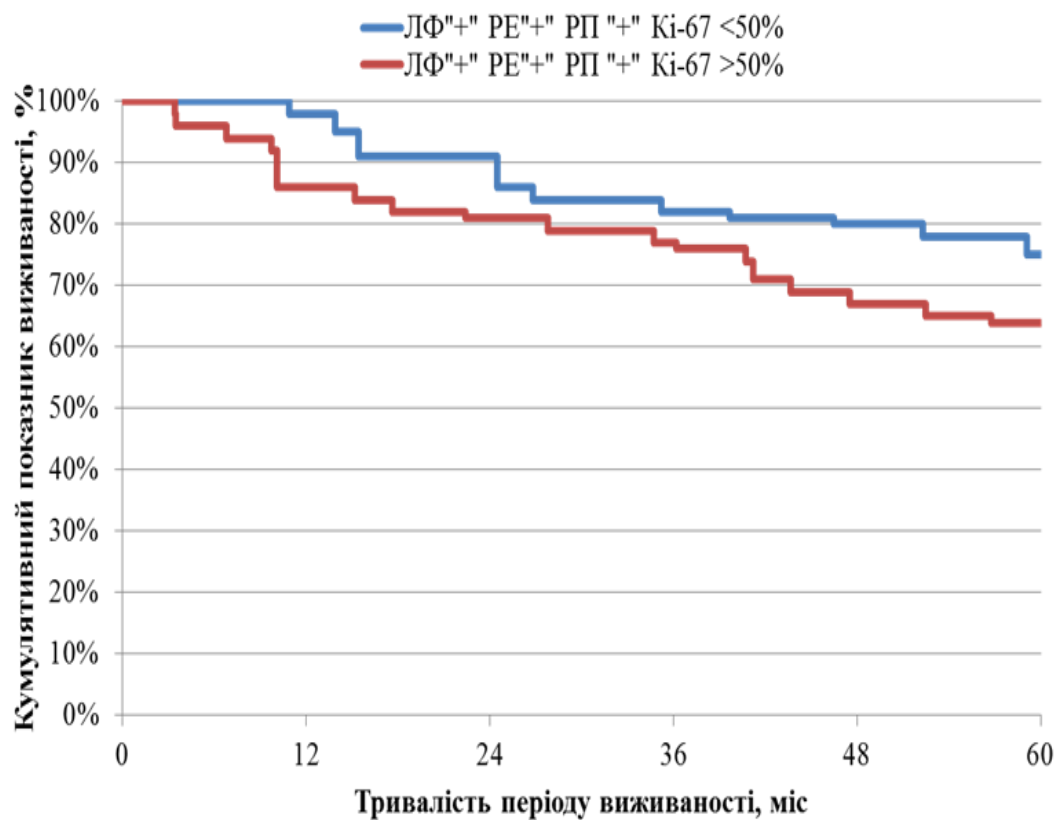


Рис. 5.7. Загальна виживаність хворих на РМЗ залежно від експресії ЛФ у пухлинній тканині, статусу експресії РЕ, РП та проліферативної активності пухлинних клітин (оцінка за Капланом-Мейером, log-rank тест - $p < 0,05$)

Підсумки. Встановлено, що показники експресії мікроРНК-214 у пухлинній тканині прямо корелюють з її рівнем у сироватці крові хворих на РМЗ. Визначено зв'язок експресії циркулюючої та пухлинної мікроРНК-214 з такими клініко-патологічними особливостями РМЗ як вік та менструальна функція хворих, а також гістологічний тип, ступінь диференціювання та молекулярний підтип пухлин. 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.

Встановлено зв'язок показників ЛФ з молекулярним профілем РМЗ. Найвищий рівень ЛФ зареєстровано у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих із рецептор-негативним (РЕ⁻, РП⁻) 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 Кі-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.

Результати досліджень, викладені у Розділі 5, опубліковані у наступних роботах: [145-148].

РОЗДІЛ 6

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні за даними світової статистики найбільш широко розповсюдженою формою онкологічної патології репродуктивної системи у жінок залишається РМЗ. Внаслідок неухильного росту показників захворюваності та смертності проблема РМЗ набуває особливої актуальності [149-151].

РМЗ також займає перше місце у структурі онкологічної захворюваності жіночого населення Європейського континенту, у тому числі України, та Сполучених Штатів Америки [152, 5]. Щорічно у світі діагностується понад мільйон хворих на РМЗ і кожного року більше, ніж 600 тис жінок помирає від цієї хвороби [5]. РМЗ на сьогодні розглядається як високогетерогенне за клінічними, морфологічними, генетичними, молекулярними характеристиками захворювання. Тепер зрозуміло, що визнану гетерогенність РМЗ як клінічної нозологічної форми онкологічної патології не можна пояснити лише в аспекті віку хворої, розмірів пухлини, кількості метастазів у регіонарні лімфатичні вузли, стадії пухлинного процесу, гістологічного типу та ступеня диференціювання пухлини. Вирішальну роль у різних проявах клінічного перебігу пухлинного процесу відіграють такі важливі фактори, як нестабільність геному та зміни молекулярно-біологічного «портрету» пухлин [153, 154]. Отже, як і раніше, нагальним питанням щодо РМЗ залишаються пошуки нових критеріїв для ранньої діагностики та удосконалення підходів до лікування, яке повинно ґрунтуватись на інформативних молекулярних маркерах, що відображають особливості патогенезу раку на системному рівні.

У цьому аспекті в останні роки в онкології все більшої актуальності набувають дослідження порушень метаболізму заліза у хворих на рак.

Важливість отримання об'єктивних уявлень щодо порушень гомеостазу заліза при виникненні та прогресії онкологічних захворювань підкреслюється у численних епідеміологічних, експериментальних та клінічних дослідженнях. Клітинні та молекулярні механізми цих порушень при злоякісному рості у молочній залозі дотепер остаточно не з'ясовано. Існують дані про синергізм порушень метаболізму заліза та стероїдних гормонів, а також тестостерону при виникненні РМЗ. Встановлено, що концентрація заліза та білків, які беруть участь в його регуляції, корелює з агресивністю ряду пухлин, у тому числі РМЗ [155, 156].

Відомо, що на клітинному і молекулярному рівні регуляція обміну заліза забезпечується через злагоджену дію залізовмісних білків, у тому числі білків-переносників [157]. На клінічному матеріалі хворих на РМЗ встановлено кореляційні зв'язки між експресією гепсидину та феритину у пухлинних клітинах із такими клініко-патологічними характеристиками, як ступінь злоякісності або ступінь диференціювання новоутворення [158, 159]. Найменш вивченим щодо причетності до патогенезу, клінічного перебігу та прогнозу РМЗ залишається ЛФ. ЛФ є чи не єдиним прикладом білка, який володіє широким спектром біологічних властивостей., зокрема, він є ключовим фактором вродженого імунітету і володіє сукупністю життєво необхідних властивостей: імуномодуючою, протизапальною та протипухлинною, а також здатен брати участь у механізмах, пов'язаних із розвитком та прогресією злоякісного росту [30]. У доступній літературі є лише поодинокі повідомлення, присвячені вивченню експресії ЛФ у пухлинних клітинах та його вмісту у периферичній крові хворих на РМЗ. Не визначені особливості кореляційних зв'язків між кількісними показниками ЛФ та клінічними, морфологічними і молекулярно-біологічними характеристиками РМЗ.

Враховуючи зазначене мета дисертаційної роботи полягала у проведенні комплексного експериментального і клінічного дослідження для

з'ясування клініко-патологічного та молекулярно- біологічного значення ЛФ у хворих на РМЗ.

Для досягнення мети було поставлено ряд задач, вирішення яких здійснювалось з використанням сучасних молекулярно-біологічних та статистичних методів дослідження.

На першому етапі нами проведено вивчення в системі *in vitro* особливостей експресії ЛФ у клітинах РМЗ різного ступеня злоякісності. 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). При цьому встановлено, що експресія ЛФ у клітинах ліній РМЗ як високого, так і низького ступеня злоякісності корелює з проліферативною та інвазивною активністю клітин з експресією РЕ та РП і адгезивними властивостями клітин.

Отже, отримані в дослідженнях *in vitro* дані переконливо свідчать про зв'язок експресії ЛФ із потенціалом злоякісності клітин та молекулярним профілем клітин РМЗ. Механізми, що призводять до збільшення рівня експресії ЛФ при формуванні ступеня злоякісності остаточно не з'ясовані. Існує думка, що підвищена експресія ЛФ супроводжується збільшенням рівня цикліну D1, що сприяє збільшенню проліферативного потенціалу гормонозалежних клітин та порушенням клітинного циклу. Поряд з цим, встановлено, що ЛФ бере участь у регуляції експресію ендотеліну-1, зв'язуючись із промоторною ділянкою його гена. Ендотелін-1 є фактором, який підтримує проліферацію злоякісно трансформованих клітин, інвазію, ангіогенез та неоваскуляризацію [160-162]. Згідно з результатами інших експериментальних досліджень ЛФ також здатен підвищувати міграцію та інвазію клітин як тричі рецептор-позитивних, так і рецептор-негативних клітинних ліній [25].

Отримані дані в експериментах *in vitro* стали підґрунтям для проведення дослідження показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах 151 хворої на РМЗ I-II стадій та оцінки його клінічного значення.

Аналіз отриманих даних дозволив встановити, що 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. Аналіз результатів імуногістохімічного визначення експресії ЛФ у пухлинній тканині хворих на РМЗ показав, що частота пухлин із позитивною детекцією продукту реакції становила 79,0%. Високий, середній та низький рівень експресії досліджуваного маркера констатовано у цитоплазмі клітин 40%, 27% та 12% хворих, відповідно, серед всієї когорти хворих на РМЗ. 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 та співпадають з даними літератури [112, 164].

Подальший аналіз дозволив встановити, що рівень ЛФ у сироватці крові достовірно збільшувався з підвищенням віку хворих, а також залежав від стану репродуктивної функції пацієток на РМЗ. Найбільші показники вмісту сироваткового ЛФ відзначено у хворих на РМЗ віком старше 60 років, що знаходились у стані менопаузи. В цій же групі пацієнтів, також ідентифіковано достовірно більшу кількість (82% випадків) пухлин, позитивних за експресією досліджуваного маркера порівняно з пацієнтами зі збереженою менструальною функцією (64% випадків). 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 [165, 166].

Оцінюючи рівень ЛФ у сироватці крові нами також встановлено, що його вміст був достовірно вищим у хворих з інфільтративним протоковим РМЗ ($r = 0,49$; $p < 0,05$), низького ступеня диференціювання ($r = -0,54$; $p < 0,05$) та базального молекулярного підтипу ($r = -0,61$; $p < 0,05$). Аналогічну

тенденцію змін експресії ЛФ встановлено при зіставленні його показників у клітинах РМЗ залежно від клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу. Зокрема, найбільшу кількість ЛФ-позитивних пухлин зафіксовано при інфільтративному протоковому РМЗ (91,1 % випадків), 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; $p < 0,05$). При цьому у пухлинах високого та помірного ступеня диференціювання, а також при люмінальному А підтипі РМЗ ідентифіковано середній рівень експресії ЛФ (100-200 балів), тоді як в усіх досліджених випадках низькодиференційованого РМЗ базального молекулярного підтипу визначено високий рівень експресії ЛФ (>200).

Існує достатня кількість публікацій, у яких показано, що інвазивний протоковий рак, за рідкісним винятком, морфологічно суттєво відрізняється від інвазивного долькового наявністю стромального компоненту, а також різних за формою та клітинним складом просторових структур [167]. На сьогодні таку внутрішньопухлинну гетерогенність пояснюють з позицій двох гіпотез: ракової стовбурової клітини та моделі клональної еволюції [168] у поєднанні з молекулярно-генетичними та епігенетичними змінами, які часто підсилюють злоякісний потенціал пухлинних клітин [169]. Отже, отримані дані свідчать, що ключовою ознакою молекулярно-біологічної гетерогенності РМЗ інвазивного протокового типу є експресія ЛФ.

Отримані дані щодо високого рівня ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах РМЗ низького ступеня диференціювання, базального молекулярного підтипу збігаються з даними наукової літератури та є підтвердженням участі цього залізов'язуючого білка у проліферації, рості та формуванні ступеня злоякісності РМЗ [109, 112, 113].

Відсутність залежності вмісту ЛФ у сироватці крові та його експресії у пухлинних клітинах від стадії захворювання та наявності метастатичного

ураження регіонарних лімфатичних вірогідно обумовлено наявністю додаткових факторів регуляції цього білка при прогресуванні пухлинного процесу, а також змінами інших метаболічних систем організму.

Певну новизну має фрагмент дослідження на клінічному матеріалі, присвячений вивченню особливостей експресії мікроРНК-214 у сироватці крові та пухлинній тканині хворих на РМЗ, що бере участь у посттрансляційній регуляції ЛФ.

МікроРНК — це малі некодуючі РНК довжиною приблизно 22 нуклеотиди, які регулюють рівень експресії матричних РНК шляхом взаємодії (інтерференції) з їх специфічними регіонами. Вони забезпечують деградацію мРНК і, таким чином, знижують рівень експресії таргетних білків завдяки зв'язуванню з 3'-некодуючим регіоном мРНК [170-171].

МікроРНК регулюють понад 30% генів людини, що беруть участь у багатьох життєво важливих процесах, таких як проліферація, диференціювання, апоптоз, регуляція імунної відповіді, тощо. Саме тому порушення регуляції мікроРНК може впливати на всі стадії канцерогенезу — від виникнення злоякісного новоутворення до його прогресії. Вони виступають як паракринні та аутокринні регулятори пухлинного мікрооточення, впливають на формування метастатичних ніш і вважаються одними із основних медіаторів паранеопластичних синдромів. Згідно з даними літератури, при різних типах раку експресується набір певних мікроРНК, зміна співвідношення яких корелює з прогресією пухлинного процесу. Саме тому визначення рівня експресії тканино-специфічних онкогенних і онкосупресорних мікроРНК є потенційно важливим для ранньої диференційної діагностики онкологічних захворювань, в тому числі РМЗ, а також для прогнозування перебігу пухлинного процесу [170, 171].

МікроРНК мають суттєву перевагу перед іншими біомаркерами внаслідок тканинної специфічності та стабільності як в пухлинній тканині, так і в біологічних рідинах (кров, лімфа, сеча, слюзи, грудне молоко, тощо). Завдяки малим розмірам вони є високостабільними не лише в умовах

організму, а і *ex vivo* у зразках клінічного матеріалу [171]. На сьогодні сформовано бази даних, в яких зібрано *in silico* передбачені мішені практично усіх відомих на сьогодні мікроРНК. Використовуючи біоінформатичні методи було встановлено, що мРНК 3'нетрансльованої області ЛФ (UTR) може бути мішенню для 37 мікроРНК. Примітно, що серед цих мікроРНК саме мікроРНК-214 містить послідовність нуклеотидів, яка максимально відповідає висококонсервативній послідовності в мРНК 3'UTR ЛФ, що вказує на те, що мікроРНК-214 може функціонально регулювати експресію та функції клітинного ЛФ. Встановлено, що мікроРНК-214 зі зрілою послідовністю 5'-ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU-3' експресується у 23 видів. Згідно досліджень проведених Liao et al. порушення експресії мікроРНК-214 асоційоване з РМЗ, а сама мікроРНК-214 окрім інгібуванні експресії ЛФ, бере участь у регулюванні процесів проліферативної активності та апоптозу злоякіснотрансформованих клітин [172].

Нами 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 пацієток старше 60 років, що знаходились у стані менопаузи. Виявлено, що рівні експресії циркулюючої та пухлинно-асоційованої мікроРНК-214 були достовірно більшими у хворих із високим ступенем диференціювання РМЗ, та у хворих із люмінальним А підтипом РМЗ. 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; $p < 0,05$).

Таким чином, 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 вказують, що ці показники можуть бути використані для предиктивної оцінки агресивності РМЗ. Вважається, що апоптоз відіграє ключову роль у розвитку і патології клітин молочної залози, а порушення балансу між проліферацією, дифференцировкою і апоптозом, яке може відбуватись внаслідок дисбалансу експресії мікроРНК-214 та ЛФ, в кінцевому підсумку призводить до мутацій і пухлинній прогресії [172].

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 – PE, PP і Ki-67. 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 (PE і PP). 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 ($p < 0,05$) рази вищим порівняно із таким у пацієнтів із новоутвореннями, що мали низький проліферативний потенціал.

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 ($p < 0,05$).

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 (РЕ⁻, РП⁻) та високою експресією Ki-67. Встановлено, 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).

Наші дані підтверджують той факт, що експресія ЛФ у пухлинних клітинах корелює з наявністю у новоутворенні РЕ [173], а рівень ЛФ в крові хворих на РМЗ — зі зниженням концентрації естрадіолу, а також узгоджується із даними літератури щодо естрогенної регуляції синтезу ЛФ на рівні організму [174]. Отримані дані співпадають з одним з досліджень показано, що

Зазначені факти ще раз підтверджують результати власних досліджень в системі *in vitro* про значення експресії ЛФ для таких показників РМЗ як проліферація, рецепторний статус, інвазивна активність та адгезивні властивості.

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії ЛФ зі статусом експресії РЕ і РП, а також проліферативною активністю новоутворень, було проаналізовано загальну виживаність хворих на РМЗ з урахуванням показників експресії зазначених маркерів. Достовірне зниження показників 5-річної загальної виживаності на 16,9%, встановлено у хворих, пухлинні клітини яких експресують ЛФ, мають негативний статус експресії РЕ, РП та високий проліферативний потенціал (експресія Ki-67 у понад 50% пухлинних клітин), ніж у хворих із молекулярним профілем пухлини ЛФ⁺, РЕ⁻, РП⁻ 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 (РЕ⁻, РП⁻) 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 Кі-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.

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. Одержані результати ще раз підкреслюють тезу, що *залізов'язуючі білки задіяні у складних біологічних процесах при РМЗ*.

Обґрунтовано можливість використання показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах для інтегральної оцінки та поглибленої характеристики пухлинного процесу у молочній залозі. Найбільш раціональним слід вважати одночасну оцінку змін ЛФ в пухлинних клітинах та сироватці крові у хворих з різною експресією гормональних рецепторів, особливо РЕ, які володіють промоторним і генотоксичним ефектом. 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.

На підставі отриманих даних запропоновано алгоритм прогнозування перебігу РМЗ (рис. 6.1.).



Рис. 6.1. Алгоритм прогнозування перебігу РМЗ

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 ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Федоренко, З. П., Гулак, Л. О., & Михайлович Ю. Й. (2021). Бюлетень національного канцер-реєстру України, 2019-2020. ЗП Федоренко–К, (22), 133.
2. Смоланка, І. І., Аксьонов, О. А., Аксьонова, О. Г., & Білоненко, Г. А. (2019). Особливості діагностики та хірургічного лікування внутрішньопротокових новоутворень грудної залози. *Український медичний часопис*, (2 (1)), 50-53. doi: 10.32471/umj.1680-3051/130/141159
3. Литвиненко, О. О., & Тацький, О. Ф. (2017). Ефективна профілактика рецидивів раку молочної залози: роль екзогенних пептидів МНР у відновленні імунного гомеостазу. *Клінічна імунологія. Алергологія. Інфектологія*, (3), 50-57.
4. Литвиненко, О. О., & Бугайцов, С. Г. (2018). Макрер проліферації потенціалу пухлини Ki-67- фактор прогнозу при місцево поширених пухлинах. *Вісник морської медицини*, (1 (78)).
5. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), 394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
6. DeSantis, C. E., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2019). Cancer statistics for African Americans, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(3), 211-233. doi: 10.3322/caac.21555.
7. Чехун, В. Ф. (2010). Сучасний стан та перспективи фундаментальних досліджень в експериментальній та клінічній онкології. *Онкологія*, 12(3) 219-223.
8. Чехун, В. Ф., Яловенко, Т. Н., Павлова, А. А., & Лукьянова, Н. Ю. (2016). Клиническое значение уровня металлодержащих белков в сыворотке крови больных раком молочной железы. *Онкологический журнал*, 10(2), 7-13.

9. Jung, M., Mertens, C., Tomat, E., & Brüne, B. (2019). Iron as a central player and promising target in cancer progression. *International journal of molecular sciences*, 20(2), 273. doi: 10.3390/ijms20020273
10. Torti, S. V., & Torti, F. M. (2020). Iron: The cancer connection. *Molecular aspects of medicine*, 100860. doi: 10.1177/1747493018778713
11. Baker, E. N., & Baker, H. M. (2009). A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, 91(1), 3-10. doi: 10.1016/j.biochi.2008.05.006
12. Chekhun, V. F., Storchai, D. M., Todor, I. N., Borikun, T. V., & Lukianova, N. Y. (2018). Antitumor and genotoxic effects of lactoferrin in Walker-256 tumor-bearing rats. *Experimental oncology*. 40(3), 200-204.
13. Nakamura, T., Naguro, I., & Ichijo, H. (2019). Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1863(9), 1398-1409. doi: 10.1177/1747493018778713
14. Muhoberac, B. B., & Vidal, R. (2019). Iron, ferritin, hereditary ferritinopathy, and neurodegeneration. *Frontiers in neuroscience*, 13, 1195. doi: 10.3389/fnins.2019.01195
15. Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G., & Pantopoulos, K. (2012). Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(3), 188-202. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.10.013
16. Zalutski, I. V., Lukianova, N. Y., Storchai, D. M., Burlaka, A. P., Shvets, Y. V., Borikun, T. V., ... & Chekhun, V. F. (2017). Influence of exogenous lactoferrin on the oxidant/antioxidant balance and molecular profile of hormone receptor-positive and-negative human breast cancer cells *in vitro*. *Experimental oncology*. 39(2): 106-111.
17. Hagag, A. A., Badraia, I. M., Abdelmageed, M. M., Hablas, N. M., Hazzaa, S. M., & Nosair, N. A. (2018). Prognostic value of transferrin Receptor-1 (CD71) expression in acute lymphoblastic leukemia. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine &*

- Metabolic Disorders*), 18(6), 610-617. doi: 10.2174/1871530318666180605094706
18. Bitonto, V., Alberti, D., Ruiu, R., Aime, S., Crich, S. G., & Cutrin, J. C. (2020). L-ferritin: A theranostic agent of natural origin for MRI visualization and treatment of breast cancer. *Journal of Controlled Release*, 319, 300-310. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.12.051
 19. Берлов, М. Н., Шехова, Е. А., Соколов, А. В., Филимонов, В. Б., & Кокряков, В. Н. (2011). Взаимодействие маннозо связывающего лектина и миелопероксидазы. *Biological Communications*, (4).
 20. Sabra, S., & Agwa, M. M. (2020). Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutical and nanotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.167
 21. Legrand, D., Ellass, E., Pierce, A., & Mazurier, J. (2004). Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals*, 17(3), 225-229. doi: 10.1023/b:biom.00000027696.48707.42
 22. Kruzel, M. L., Zimecki, M., & Actor, J. K. (2017). Lactoferrin in a context of inflammation-induced pathology. *Frontiers in immunology*, 8, 1438. doi: 10.3389/fimmu.2017.01438
 23. Cutone, A., Lepanto, M. S., Rosa, L., Scotti, M. J., Rossi, A., Ranucci, S., ... & Berlutti, F. (2019). Aerosolized bovine lactoferrin counteracts infection, inflammation and iron dysbalance in a cystic fibrosis mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2128. doi: 10.3390/ijms20092128
 24. Cutone, A., Rosa, L., Ianaro, G., Lepanto, M. S., Bonaccorsi di Patti, M. C., Valenti, P., & Musci, G. (2020). Lactoferrin's anti-cancer properties: Safety, selectivity, and wide range of action. *Biomolecules*, 10(3), 456. doi: 10.3390/biom10030456
 25. Suzuki, Y. A., & Lönnnerdal, B. (2004). Baculovirus expression of mouse lactoferrin receptor and tissue distribution in the mouse. *Biometals*, 17(3), 301-309. doi: 10.1023/b:biom.00000027709.42733.e4

26. Duarte, D. C., Nicolau, A., Teixeira, J. A., & Rodrigues, L. R. (2011). The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. *Journal of dairy science*, 94(1), 66-76. doi: 10.3168/jds.2010-3629
27. Guedes, J. P., Pereira, C. S., Rodrigues, L. R., & Côrte-Real, M. (2018). Bovine milk lactoferrin selectively kills highly metastatic prostate cancer PC-3 and osteosarcoma MG-63 cells in vitro. *Frontiers in oncology*, 8, 200. doi: 10.3389/fonc.2018.00200
28. Chekhun, V. F., Zalutskii, I. V., Naleskina, L. A., Lukianova, N. Y., Yalovenko, T. M., Borikun, T. V., ... & Lukashevich, V. S. (2015). Modifying effects of lactoferrin in vitro on molecular phenotype of human breast cancer cells. *Experimental oncology*. 37(3):181-6.
29. Hu, L., Gao, C. H., Hong, C., Zhong, Q., Dong, H. L., & Gao, X. M. (2016). Expression, purification, and breast cancer cell inhibiting effect of recombinant human lactoferrin C-lobe. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(2), 257-263. doi: 10.1080/09168451.2015.1088376
30. Hwang, S. M., Chung, I. Y., Jo, J. H., Yoon, T. J., & Lee, H. H. (2016). Comparison of proliferative effect of human lactoferrin and its proteolytic peptide on normal and transformed epithelial cells. *Applied biochemistry and biotechnology*, 178(1), 44-57. doi: 10.1007/s12010-015-1857-y
31. Смоланка, І. І. (2009). Профілактика і рання діагностика раку молочної залози. *Жіночий лікар*, (5), 40-45.
32. DeSantis, C. E., Ma, J., Goding Sauer, A., Newman, L. A., & Jemal, A. (2017). Breast cancer statistics, 2017, racial disparity in mortality by state. *CA: a cancer journal for clinicians*, 67(6), 439-448. doi: 10.3322/caac.21412
33. Рагимзаде, С. Э. (2017). Рак молочной железы: эпидемиология, факторы риска, патогенез, диагностика, прогноз. *Міжнародний медичний журнал*, (23, № 2), 60-64.
34. DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., ... & Siegel, R. L. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, 69(6), 438-451. doi 10.3322/caac.21583

35. Жильчук, А. В., & Проценко, В. В. (2016). Значення прогностичних чинників для вибору тактики лікування хворих на рак молочної залози, зокрема з метастатичним ураженням кісток. *Хірургія України*, (2), 83-89.
36. Грибач, С. М., Бородай, Н. Б., & Чехун, В. Ф. (2011). Клініко-біологічні особливості перебігу раку молочної залози у хворих похилого віку. *Онкологія*. 13(14). 260-265.
37. Колядина, И. В., Поддубная, И. В., Франк, Г. А., Комов, Д. В., Карселадзе, А. И., Ермилова, В. Д., & Вишневская, Я. В. (2015). Гетерогенность рака молочной железы I стадии: биологическое и прогностическое значение. *Злокачественные опухоли*, (1). 2015;(1):35-45.
38. DeSantis, C. E., Fedewa, S. A., Goding Sauer, A., Kramer, J. L., Smith, R. A., & Jemal, A. (2016). Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66(1), 31-42. doi: 10.3322/caac.21320
39. Tao, Z., Shi, A., Lu, C., Song, T., Zhang, Z., & Zhao, J. (2015). Breast cancer: epidemiology and etiology. *Cell biochemistry and biophysics*, 72(2), 333-338. doi: 10.1007/s12013-014-0459-6
40. Hortobagyi, G. N., de la Garza Salazar, J., Pritchard, K., Amadori, D., Haidinger, R., Hudis, C. A., & ABREAST Investigators. (2005). The global breast cancer burden: variations in epidemiology and survival. *Clinical breast cancer*, 6(5), 391-401. doi: 10.3816/cbc.2005.n.043
41. Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast cancer treatment: a review. *Jama*, 321(3), 288-300. doi: 10.1001/jama.2018.19323
42. Althuis, M. D., Fergenbaum, J. H., Garcia-Closas, M., Brinton, L. A., Madigan, M. P., & Sherman, M. E. (2004). Etiology of hormone receptor-defined breast cancer: a systematic review of the literature. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 13(10), 1558-1568. doi:
43. Terzi, S., Trentin, F., Carretta, E., Pipola, V., Ghermandi, R., Bròdano, G. B., ... & Gasbarrini, A. (2020). Breast cancer spinal metastases: Prognostic factors

affecting survival after surgery. A retrospective study. *Journal of Clinical Neuroscience*, 78, 73-78.

44. Паламарчук, В. Б., Плакида, А. О., & Даценко, Г. В. (2015). Рак молочної залози, етіологічні чинники, клінічні ознаки, методи діагностики, лікування та профілактики. *Biomedical and biosocial anthropology*, (24), 225-230.

45. Пономарев В.Е., Поликарпова С.Б., Мехтиева Н.И., Шагина Н.Ю., Вишневская Я.В., Селиванова В.В. Первично - операбельный рак молочной железы: молекулярно - биологические подтипы и морфологические факторы прогноза. *Сеченовский вестник*. 2019;10(2):5-13.

46. Чехун ВФ, Шербан СД, Савцова ЗД. Гетерогенность опухоли—динамическое состояние. *Онкология* 2012; 14 (1): 4–12.

47. Бондаренко, И. Н., Эльхажж, М. Х., Прохач, А. В., Завизион, В. Ф., и Чебанов, К. О. (2016). Рак молочной железы. От молекулярной биологии к персонифицированной терапии. *Morphologia*, 10(1), pp. 18-25.

48. Налескіна, Л.А., Лук'янова Н.Ю. та Чехун, В.Ф. (2017). Молекулярно-генетичні засади клінічної гетерогенності раку молочної залози. *Онкология*, 19(3), 171-179.

49. Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*; 406 (6797), pp.747–752. doi: 10.1038/35021093

50. Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani R. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10869-10874.

51. Russnes, H. G., Lingjærde, O. C., Børresen-Dale, A. L., & Caldas, C. (2017). Breast cancer molecular stratification: from intrinsic subtypes to integrative clusters. *The American journal of pathology*, 187(10), 2152-2162.

52. Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev.*, 38, pp. 698–707. doi: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005

53. Седаков, И. Е., Смирнов, В. Н., Мотрий, А. В., Скочиляс, Т. Л., Садрицкая, Я. В., & Мотрий, М. О. (2019). Многоликий рак молочной железы: от внутриопухолевой гетерогенности до изменения иммунофенотипа опухоли. *Новообразование*, 11(2), 58-62.
54. Curtis, C., Shah, S. P., Chin, S. F., Turashvili, G., Rueda, O. M., Dunning, M. J., Gräf, S. (2012). The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, 486(7403), pp. 346-352. doi: 10.1038/nature10983
55. Налескіна, Л.А., Лук'янова Н.Ю. та Чехун, В.Ф. (2017). Молекулярно-генетичні засади клінічної гетерогенності раку молочної залози. *Онкологія*, 19(3), сс. 171-179.
56. Polyak, K. (2011). Heterogeneity in breast cancer. *The Journal of clinical investigation*, 121(10), 3786-3788.
57. Гришина, К. А., Музаффарова, Т. А., Хайленко, В. А. и Карпухин, А. В. (2016). Молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы*, 3, 36-42.
58. Dean-Colomb, W., & Esteva, F. J. (2008). Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *European Journal of Cancer*, 44(18), 2806-2812. doi: 10.1016/j.ejca.2008.09.013
59. Cameron, D., Piccart-Gebhart, M. J., Gelber, R. D., Procter, M., Goldhirsch, A., de Azambuja, E., ... & Herceptin Adjuvant (HERA) Trial Study Team. (2017). 11 years' follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive early breast cancer: final analysis of the HERceptin Adjuvant (HERA) trial. *The Lancet*, 389(10075), 1195-1205. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32616-2
60. Герштейн, Е. С. (2015). Биологические маркеры как основа персонализированной терапии в клинической онкологии. Молекулярная медицина, (2), сс. 19-23. Бондарь, Г. В., Седаков, И. Е., Смирнов, В. Н., Поминчук, Д. В. и Кульков, С. К. (2017). Значение маркеров прогноза опухоли в персонализации лечения больных раком молочной железы. *Новообразование*, 11(1), сс. 319-325.

61. Inoue, K. and Fry, E. A. (2016). Novel molecular markers for breast cancer. *Biomarkers in cancer*, 8, BIC-S38394. doi: 10.4137/BIC.S38394
62. Banin Hirata, B. K., Oda, J. M. M., Losi Guembarovski, R., Ariza, C. B., Oliveira, C. E. C. D. and Watanabe, M. A. E. (2014). Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. *Disease markers*, 1-12. doi: 10.1155/2014/513158
63. Щербіна, О. В. (2008). Пухлинні маркери: роль у клінічній практиці. *Онкологія*, 10(2), 269-272.
64. Pedersen, A. C., Sørensen, P. D., Jacobsen, E. H., Madsen, J. S. and Brandslund, I. (2013). Sensitivity of CA 15-3, CEA and serum HER2 in the early detection of recurrence of breast cancer. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 51(7), pp. 1511-1519. doi: 10.1515/cclm-2012-0488
65. Stieber, P., Nagel, D., Blankenburg, I., Heinemann, V., Untch, M., Bauerfeind, I. and Di Gioia, D. (2015). Diagnostic efficacy of CA 15-3 and CEA in the early detection of metastatic breast cancer—a retrospective analysis of kinetics on 743 breast cancer patients. *Clinica chimica acta*, 448, pp. 228-231. doi: 10.1016/j.cca.2015.06.022
66. Shao, Y., Sun, X., He, Y., Liu, C. and Liu, H. (2015). Elevated levels of serum tumor markers CEA and CA15-3 are prognostic parameters for different molecular subtypes of breast cancer. *PloS one*, 10(7), e0133830. doi: 10.1371/journal.pone.0133830
67. Duffy, M. J. (2013). Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers. *Medical Principles and Practice*, 22(1), pp. 4-11. doi: 10.1159/000338393
68. Shevchenko, T. M., Gazdyuk, P. V., Bondar, A. M., and Govoruha, O. Y. (2017). Immunohistochemical tests for diagnostics of infiltrative forms of breast cancer and identification of molecular subtype in women of different ages in Dnipro city. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8(2), pp. 204–209.
69. Білий, О. М., Вінніков, В. А., Красносельський, М. В., & Мітряєва, Н. А. (2016). Перспективи використання молекулярно-біологічних маркерів при

місцево розповсюдженому раку грудної залози. *Ukrainian Journal of Radiology*, 24(1), сс. 34-42.

70. Артамонова, Е. В., Тупицын, Н. Н., Кадагидзе, З. Г., и Летягин, В. П. (2002). Роль эпителиальных анти генов в диагностике и стадировании рака молочной железы. *Архив патологии*, 64(6), 13-15.

71. Fridman, V., Humblet, C., Bonjean, K., and Boniver, J. (2000). Assessment of tumor angiogenesis in invasive breast carcinomas: absence of correlation with prognosis and pathological factors. *Virchows Archiv*, 437(6), 611-617. doi: 10.1007/s004280000292

72. Heffelfinger, S. C., Yassin, R., Miller, M. A. and Lower, E. E. (2000). Cyclin D1, retinoblastoma, p53, and Her2/neu protein expression in preinvasive breast pathologies: correlation with vascularity. *Pathobiology*, 68(3), pp. 129-136. doi: 10.1159/000055913

73. Ryska, A., Hovorkova, E. and Skrabkova Z. (2001). Imunohistochemick studie. *Angiogeneze. Cesk. Patol*, 37, pp. 91–98.

74. Lee, A. H. S., Gillett, C. E., Ryder, K., Fentiman, I. S., Miles, D. W. and Millis, R. R. (2006). Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. *Histopathology*, 48(6), pp. 692-701. doi: 10.1111/j.1365-2559.2006.02410.x

75. Shen, Q., Sahin, A. A., Hess, K. R., Suki, D., Aldape, K. D., Sawaya, R. and Ibrahim, N. K. (2015). Breast cancer with brain metastases: clinicopathologic features, survival, and paired biomarker analysis. *The oncologist*, 20(5), pp. 466-473. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0107

76. Murakami, N., Koufuji, K. and Shirouzu, K. (2001). Influence of hepatocyte growth factor secreted from fibroblasts on the growth and invasion of scirrhous gastric cancer. *International surgery*, 86(3), pp. 151-157.

77. Changavi, A. A., Shashikala, A. and Ramji, A. S. (2015). Epidermal growth factor receptor expression in triple negative and nontriple negative breast carcinomas. *Journal of laboratory physicians*, 7(2), 79-86. doi: 10.4103/0974-2727.163129.

78. Kim, E. S., Kim, M. S., & Moon, A. (2004). TGF- β -induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *International journal of oncology*, 25(5), 1375-1382.
79. Li, C., Guo, B., Bernabeu, C., & Kumar, S. (2001). Angiogenesis in breast cancer: the role of transforming growth factor β and CD105. *Microscopy research and technique*, 52(4), 437-449. doi: 10.1002/1097-0029(20010215)52
80. Tran, W. T., Childs, C., Probst, H., Farhat, G., & Czarnota, G. J. (2018). Imaging biomarkers for precision medicine in locally advanced breast cancer. *Journal of medical imaging and radiation sciences*, 49(4), 342-351. doi: 10.1016/j.jmir.2017.09.006
81. Lai, L. C. (2002). Role of steroid hormones and growth factors in breast cancer. doi: 10.1515/CCLM.2002.170
82. Liehr, J. G., & Jones, J. (2001). Role of iron in estrogen-induced cancer. *Current medicinal chemistry*, 8(7), 839-849. doi: 10.2174/0929867013372931
83. Lee, D. H., Anderson, K. E., Harnark, L. J., & Jacobs, D. R. (2004). Dietary iron intake and breast cancer: The Iowa Women's Heath Study.
84. E. Cavaliere, D. Chakravarti, J. Guttenplan, Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention, *Biochim. Biophys. Acta* 1766 (2006) 63–78. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.03.001
85. S. Wyllie, J.G. Liehr, Release of iron from ferritin storage by redox cycling of stilbene and steroid estrogen metabolites: a mechanism of induction of free radical damage by estrogen, *Arch. Biochem. Biophys.* 346 (1997) 180–186. doi: 10.1006/abbi.1997.0306
86. L.R. Zacharski, D.L. Ornstein, S. Woloshin, L.M. Schwartz, Association of age, sex, and race with body iron stores in adults: analysis of NHANES III data, *Am. Heart J.* 140 (2000) 98–104. doi: 10.1067/mhj.2000.106646
87. N. Milman, M. Kirchhoff, T. Jorgensen, Iron status markers, serum ferritin and hemoglobin in 1359 Danish women in relation to menstruation, hormonal

- contraception, parity, and postmenopausal hormone treatment, *Ann. Hematol.* 65 (1992) 96–102. doi: 10.1007/BF01698138
88. Marques, O., da Silva, B. M., Porto, G., & Lopes, C. (2014). Iron homeostasis in breast cancer. *Cancer Letters*, 347(1), 1–14. doi:10.1016/j.canlet.2014.01.029
89. Brueggemeier, R. W., Richards, J. A., & Petrel, T. A. (2003). Aromatase and cyclooxygenases: enzymes in breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 86(3-5), 501-507. doi: 10.1016/s0960-0760(03)00380-7
90. Orino, K., Lehman, L., Tsuji, Y., Ayaki, H., Torti, S. V., & Torti, F. M. (2001). Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 357(1), 241-247. doi: 10.1042/0264-6021:3570241.
91. Milman, N., & Moller Pedersen, L. (2002). The serum ferritin concentration is a significant prognostic indicator of survival in primary lung cancer. *Oncology reports*, 9(1), 193-198.
92. Ulbrich, E. J., Lebrecht, A., Schneider, I., Ludwig, E., Koelbl, H., & Hefler, L. A. (2003). Serum parameters of iron metabolism in patients with breast cancer. *Anticancer research*, 23(6D), 5107-5109.
93. Yang, D. C., Wang, F., Elliott, R. L., & Head, J. F. (2001). Expression of transferrin receptor and ferritin H-chain mRNA are associated with clinical and histopathological prognostic indicators in breast cancer. *Anticancer research*, 21(1B), 541-549.
94. Кит О.И., Горошинская И.А., Тарнопольская О.В., Геворкян Ю.А., Малейко М.Л., Снежко А.В., Немашкалова Л.А., Абакумова С.В. Содержание ферритина и трансферрина в крови больных раком прямой кишки в первую неделю после операции. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016;(8):40-45.
95. Vandewalle, B., Hornez, L., Revillion, F., & Lefebvre, J. (1989). Secretion of transferrin by human breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 163(1), 149-154

96. Лук'янова, Н. Ю., Яловенко, Т. М., & Чехун, В. Ф. (2015). Особливості експресії гепсидину у хворих на рак молочної залози. *Онкологія*, (17, № 4), 258-262.
97. Kanyshkova, T. G., Buneva, V. N., & Nevinsky, G. A. (2001). Lactoferrin and its biological functions. *Biochemistry (Moscow)*, 66(1), 1-7. doi: 10.1023/a:1002817226110
98. Wistuba, I. I., Behrens, C., Virmani, A. K., Mele, G., Milchgrub, S., Girard, L., ... & Minna, J. D. (2000). High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Research*, 60(7), 1949-1960.
99. Nakajima, K. I., Nakamura, M., Gao, X. D., & Kozakai, T. (2008). Possible involvement of prolactin in the synthesis of lactoferrin in bovine mammary epithelial cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 72(4), 1103-1106. doi: 10.1271/bbb.70713.
100. Разин С.В. Ген лактоферрина и его регуляция
101. Anderson, B. F., Baker, H. M., Dodson, E. J., Norris, G. E., Rumball, S. V., Waters, J. M., & Baker, E. N. (1987). Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(7), 1769-1773. doi: 10.1073/pnas.84.7.1769
102. Lönnerdal, B., & Iyer, S. (1995). Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annual review of nutrition*, 15(1), 93-110. doi: 10.1146/annurev.nu.15.070195.000521.
103. Hardivillé, S., Hoedt, E., Mariller, C., Benaïssa, M., & Pierce, A. (2010). O-GlcNAcylation/phosphorylation cycling at Ser10 controls both transcriptional activity and stability of Δ -lactoferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 285(25), 19205-19218. doi: 10.1074/jbc.M109.080572.
104. González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International journal of antimicrobial agents*, 33(4), 301-e1. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2008.07.020

105. Bagby, G. C., Rigas, V. D., Bennett, R. M., Vandenbark, A. A., & Garewal, H. S. (1981). Interaction of lactoferrin, monocytes, and T lymphocyte subsets in the regulation of steady-state granulopoiesis in vitro. *The Journal of clinical investigation*, 68(1), 56-63. doi: 10.1172/jci110254
106. Bagby, G. C. (1989). Regulation of granulopoiesis: the lactoferrin controversy. *Blood cells*, 15(2), 386-399.
107. Siqueiros-Cendón, T., Arévalo-Gallegos, S., Iglesias-Figueroa, B. F., García-Montoya, I. A., Salazar-Martínez, J., & Rascón-Cruz, Q. (2014). Immunomodulatory effects of lactoferrin. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35(5), 557-566. doi: 10.1038/aps.2013.200
108. Roy, M. K., Kuwabara, Y., Hara, K., Watanabe, Y., & Tamai, Y. (2002). Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. *Journal of dairy science*, 85(9), 2065-2074. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74284-7
109. Iglesias-Figueroa, B. F., Siqueiros-Cendón, T. S., Gutierrez, D. A., Aguilera, R. J., Espinoza-Sánchez, E. A., Arévalo-Gallegos, S., ... & Rascón-Cruz, Q. (2019). Recombinant human lactoferrin induces apoptosis, disruption of F-actin structure and cell cycle arrest with selective cytotoxicity on human triple negative breast cancer cells. *Apoptosis*, 24(7), 562-577. doi: 10.1007/s10495-019-01539-7
110. Kever, M. E., Kaul, A., Nowicki, B., Findley, W. E., Hutchens, T. W., & Nagamani, M. (1996). Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *American Journal of Reproductive Immunology*, 36(5), 243-247. doi: 10.1111/j.1600-0897.1996.tb00171.x.
111. Sugihara, Y., Zuo, X., Takata, T., Jin, S., Miyauti, M., Isikado, A., ... & Shimamoto, F. (2017). Inhibition of DMH-DSS-induced colorectal cancer by liposomal bovine lactoferrin in rats. *Oncology letters*, 14(5), 5688-5694. doi: 10.3892/ol.2017.6976
112. Rossiello, R., Carriero, M. V., & Giordano, G. G. (1984). Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue. *Journal of clinical pathology*, 37(1), 51-55. doi: 10.1136/jcp.37.1.51

113. Schulz, D. M., Böllner, C., Thomas, G., Atkinson, M., Esposito, I., Höfler, H., & Aubele, M. (2009). Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry. *Journal of proteome research*, 8(7), 3430-3438. doi: 10.1021/pr900071h.
114. Invitrogen, G. Cell culture basics. Life technologies. 2014.
115. Rusetskaya, N. V., Lukyanova, N. Y., & Chekhun, V. F. (2009). Molecular profile and cell cycle in MCF-7 and MCF-7/Dox cells exposed to conventional and liposomal forms of doxorubicin. *Experimental oncology*. 31(3), 140-143.
116. Chekhun, S. V., Zadvorny, T. V., Tymovska, Y. O., Anikusko, M. F., Novak, O. E., & Polishchuk, L. Z. (2015). CD44+/CD24? markers of cancer stem cells in patients with breast cancer of different molecular subtypes. *Experimental oncology*, (37, № 1), 58-63.
117. Андріїв А. В. Прогностичне та предиктивне значення NA+/I-симпортеру у хворих на рак молочної залози [Автореферат] : автореф. дис. на здоб. наук. ступ. к.м.н. : спец. 14.01.07 "Онкологія" / Аліна Володимирівна Андріїв ; НАНУ Ін-т експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького. – К., 2018.
118. Борікун Т.В. Пухлинно-асоційовані мікроРНК як фактор оцінки агресивності перебігу раку молочної залози [Автореферат] : автореф. дис. канд. біол. наук : 14.01.07 / Борікун Тетяна Вікторівна ; Нац. акад. наук України ; Ін-т експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького. – Київ, 2019
119. Greene, F. L., Balch, C. M., Fleming, I. D., Fritz, A., Haller, D. G., Morrow, M., & Page, D. L. (Eds.). (2002). *AJCC cancer staging handbook: TNM classification of malignant tumors*. Springer Science & Business Media.
120. Sobin, L. H., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (Eds.). (2011). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons.
121. Budwit-Novotny D., McCarty K., Cox E., Soper J., Mutch D., Creasman W., Flowers J. and McCarty K., (1986). Immunohistochemical analyses of estrogen

- receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody., *Cancer Research*, 46(10), 5419–25.
122. Lakhani, S. R. (2014). Update on WHO breast classification-2 years on. *Pathology*, 46, S1.
 123. Dorak, M. T. (Ed.). (2007). *Real-time PCR*. Taylor & Francis.
 124. Chernov A.N., Barantsevich E.P., Kalunov V.N., Galagudza M.M. (2018). The methods of in vitro selection of chemotherapeutic druds for individual chemotherapy of maligant tumors in patinets. *Translational Medicine*, 5 (1), 45–65. doi: 10.20538/1682-0363-2018-3-188–196
 125. Chekhun, V. F., Zalutskii, I. V., Naleskina, L. A., Lukianova, N. Y., Yalovenko, T. M., Borikun, T. V., Lukashevich, V. S. (2015). Modifying effects of lactoferrin in vitro on molecular phenotype of human breast cancer cells. *Experimental oncology*, 37(3), 181-186.
 126. Жогина, Ж. А., Мусабаева, Л. И., & Слонимская, Е. М. (2003). Влияние клиничко-морфологических факторов на течение и прогноз ранних форм рака молочной железы. *Сибирский онкологический журнал*, (3), 7-10.
 127. Rouzier, R., Perou, C. M., Symmans, W. F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., & Pusztai, L. (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical cancer research*, 11(16), 5678-5685. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2421
 128. Fallahpour, S., Navaneelan, T., De, P., & Borgo, A. (2017). Breast cancer survival by molecular subtype: a population-based analysis of cancer registry data. *CMAJ open*, 5(3), E734. doi: 10.9778/cmajo.20170030
 129. Munoz, D. F., & Plevritis, S. K. (2018). Estimating breast cancer survival by molecular subtype in the absence of screening and adjuvant treatment. *Medical Decision Making*, 38(suppl 1), 32S-43S. doi: 10.1177/0272989X17743236
 130. Li, D., Sakashita, S., Morishita, Y., Kano, J., Shiba, A., Sato, T., & Noguchi, M. (2011). Binding of lactoferrin to IGBP1 triggers apoptosis in a lung adenocarcinoma cell line. *Anticancer research*, 31(2), 529-534.

131. Brock, J. H. (2002). The physiology of lactoferrin. *Biochemistry and Cell biology*, 80(1), 1-6. doi : 10.1139/o01-212
132. Shaheduzzaman, S., Vishwanath, A., Furusato, B., Cullen, J., Chen, Y., Bañez, L., & Srivastava, S. (2007). Silencing of Lactotransferrin expression by methylation in prostate cancer progression. *Cancer biology & therapy*, 6(7), 1088-1095. doi: 10.4161/cbt.6.7.4327
133. 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., Chepurnaty 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. *Horizons in Cancer Research*, 2017, Volume 66, Chapter 3. 51-85.
134. Nalieskina L.A., Lukianova N.Y., Sobchenko S.O., Storchai D.M., Chekhun V.F. (2016). Lactoferrin expression in breast cancer in relation to biologic properties of tumors and clinical features of disease. *Experimental oncology*, 38(3). 181-186.
135. Лозовская Ю.В., Лукьянова Н.Ю., Задворный Т.В., Собченко С.А., Чехун В.Ф. (2016). Прогностические сывороточные биомаркеры рака молочной железы: лактоферрин, лактатдегидрогеназа и С-реактивный протеин. *Онкологический журнал (Беларусь)*, 10, (4), 33-41.
136. Тимовська Ю.О., Анікусько М.Ф., Собченко С.О. (2013). Відносне значення окремих факторів ризику у виникненні раку молочної залози у жінок різного вікового періоду. *Онкологія*, 15(3), 219-223.
137. Чехун В.Ф., Налєскіна Л.А., Сторчай Д.М., Собченко С.О., Шепеленко І.В., Кунська Л.М. Патент України на корисну модель. 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.

138. Лук'янова Н.Ю., Налєскіна Л.А., Сторчай Д.М., Собченко С.О., Ключов О.М., Чехун В.Ф. (2018). Спосіб персоналізованого прогнозу агресивності перебігу раку молочної залози. Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 354.
139. 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. (2015). 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*.17(3), 199.
140. Лук'янова Н.Ю., Собченко С.О., Чехун В.Ф. (2016). 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 *Укр. Радіол. Журн.* (Спец. вип. 1), 203.
141. Налєскіна Л.А. Лук'янова Н.Ю., Собченко С.О. (2016). 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.* (Спец. вип. 1), 202.
142. Лук'янова 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*. 2(4), 306.
143. Садчиков, П. Е., Гольдман, И. Л., Разин, С. В., Черноусов, А. Д., Алексеева, Л. И., & Садчикова, Е. Р. (2016). Молекулярный механизм влияния лактоферрина на костеобразование. Критический обзор. *Остеопороз и остеопатии*, (3), 12-22.

144. Liao, Y., Du, X., & Lönnnerdal, B. (2010). miR-214 regulates lactoferrin expression and pro-apoptotic function in mammary epithelial cells. *The Journal of nutrition*, 140(9), 1552-1556. doi: 10.3945/jn.110.124289
145. Ключосов А.Н., Аникусько Н.Ф., Любота И.И., Савчук С.А., Катеринич А.А., Нейман А.М., Малец М.С., Собченко С.А., Долинский Ф.С. (2013). Интраоперационная цитологическая оценка наличия метастазов рака молочной железы в сторожевых лимфатических узлах. *Архів клінічної та експериментальної медицини*. 22(1), 32-43.
146. Лук'янова Н.Ю., Чехун В.Ф., Собченко С.О., Базась В.М., Ключосов О.М., Чехун С.В., Демаш Д.В., Яловенко Т.М., Борікун Т.В. (2016). Патент України на корисну модель. Спосіб визначення базального молекулярного підтипу пухлин у хворих на рак молочної залози. Патент України на корисну модель № 111915. Дата публікації 2016/11/25.
147. Чехун В.Ф., Лук'янова Н.Ю., Шепеленко І.В., Борікун Т.В., Чехун С.В., Ключосов О.М., Собченко С.О. (2016). Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози. Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 191-2016.
148. Чехун В.Ф., Лук'янова Н.Ю., Ключосов О.М., Собченко С.О., Чехун С.В., Павлова А.О., Яловенко Т.М., Смоланка І.І. (2016). Металовмісні білки як маркери моніторингу перебігу та ефективності хіміотерапевтичного лікування хворих на рак молочної залози. Методичні рекомендації. - К., 2016. – 27 с.
149. Momenimovahed, Z., & Salehiniya, H. (2019). Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer: Targets and Therapy*, 11, 151-164. PMC: 6462164
150. Azamjah, N., Soltan-Zadeh, Y., & Zayeri, F. (2019). Global trend of breast cancer mortality rate: a 25-year study. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, 20(7), 2015-2020. doi:10.31557/APJCP.2019.20.7.2015
151. Ahmad, A. (2019). Breast cancer statistics: recent trends. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance*, 1-7. doi: 10.1007/978-3-030-20301-6_1

152. Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 65(2), 87-108.
153. Januškevičienė, I., & Petrikaitė, V. (2019). Heterogeneity of breast cancer: The importance of interaction between different tumor cell populations. *Life sciences*, 239, 117009. doi: 10.1016/j.lfs.2019.117009
154. Ellsworth, R. E., Blackburn, H. L., Shriver, C. D., Soon-Shiong, P., & Ellsworth, D. L. (2017). Molecular heterogeneity in breast cancer: State of the science and implications for patient care. *In Seminars in cell & developmental biology*, 64, 65-72. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.08.025
155. Chang, V. C., Cotterchio, M., & Khoo, E. (2019). Iron intake, body iron status, and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC cancer*, 19(1), 1-28. doi: 10.1186/s12885-019-5642-0
156. Scimeca, M., & Bonanno, E. (2018). New highlight in breast cancer development: the key role of hepcidin and iron metabolism. *Annals of translational medicine*, 6(Suppl 1), S56. doi: 10.21037/atm.2018.10.30
157. Baker, E. N. & Baker, H. M. (2009) A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. *Biochimie*, 91(1), 3–10.
158. Jerzak, K. J., Lohmann, A. E., Ennis, M., Nemeth, E., Ganz, T., & Goodwin, P. J. (2020). Prognostic associations of plasma hepcidin in women with early breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 184(3), 927-935. doi: 10.1007/s10549-020-05903-z
159. Pandolfi, L., Bellini, M., Vanna, R., Morasso, C., Zago, A., Carcano, S., & Prosperi, D. (2017). H-ferritin enriches the curcumin uptake and improves the therapeutic efficacy in triple negative breast cancer cells. *Biomacromolecules*, 18(10), 3318-3330. doi: 10.1021/acs.biomac.7b00974
160. Carducci, M. A., Padley, R. J., Breul, J., Vogelzang, N. J., Zonnenberg, B. A., Daliani, D. D., & Nelson, J. B. (2003). Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate

- cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, 21(4), 679-689. doi: 10.1007/s12010-015-1857-y.
161. Rosanò, L., Varmi, M., Salani, D., Di Castro, V., Spinella, F., Natali, P. G., & Bagnato, A. (2001). Endothelin-1 induces tumor proteinase activation and invasiveness of ovarian carcinoma cells. *Cancer Research*, 61(22), 8340-8346.
 162. Salani, D., Di Castro, V., Nicotra, M. R., Rosanò, L., Tecce, R., Venuti, A., ... & Bagnato, A. (2000). Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *The American journal of pathology*, 157(5), 1537-1547. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64791-8
 163. Suzuki, Y.A., Shin, K. and Lonnerdal, B. (2004). Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry*, 40, 15771–15779
 164. Campbell, T., Skilton, R. A., Coombes, R. C., Shousha, S., Graham, M. D., & Luqmani, Y. A. (1992). Isolation of a lactoferrin cDNA clone and its expression in human breast cancer. *British journal of cancer*, 65(1), 19-26. doi: 10.1038/bjc.1992.4
 165. Ward, P. P., Paz, E., & Conneely, O. M. (2005). Lactoferrin. *Cellular and molecular life sciences*, 62(22), 2540-2548. doi: 10.1007/s00018-005-5369-8
 166. Yang, N., Shigeta, H., Shi, H., & Teng, C. T. (1996). Estrogen-related receptor, hERR1, modulates estrogen receptor-mediated response of human lactoferrin gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), 5795-5804. doi: 10.1074/jbc.271.10.5795
 167. Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Tashireva, L. A., Gerashchenko, T. S., Litviakov, N. V., Skryabin, N. A., & Perelmuter, V. M. (2013). Phenotypic drift as a cause for intratumoral morphological heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma not otherwise specified. *BioResearch Open Access*, 2(2), 148-154. doi: 10.1089/biores.2012.0278
 168. Esparza-López, J., Escobar-Arriaga, E., Soto-Germes, S., & de Jesús Ibarra-Sánchez, M. (2017). Breast cancer intra-tumor heterogeneity: one tumor, different entities. *Revista de investigacion clinica*, 69(2), 66-76.

169. Aleskandarany, M. A., Vandenberghe, M. E., Marchiò, C., Ellis, I. O., Sapino, A., & Rakha, E. A. (2018). Tumour heterogeneity of breast cancer: from morphology to personalised medicine. *Pathobiology*, 85(1-2), 23-34.
170. Sathipati, S. Y., & Ho, S. Y. (2018). Identifying a miRNA signature for predicting the stage of breast cancer. *Scientific reports*, 8(1), 1-11. doi: 10.1038/s41598-018-34604-3
171. Adhami, M., Haghdoost, A. A., Sadeghi, B., & Afshar, R. M. (2018). Candidate miRNAs in human breast cancer biomarkers: a systematic review. *Breast Cancer*, 25(2), 198-205. doi: 10.1007/s12282-017-0814-8
172. Liao, Y., Du, X., & Lönnerdal, B. (2010). miR-214 regulates lactoferrin expression and pro-apoptotic function in mammary epithelial cells. *The Journal of nutrition*, 140(9), 1552-1556.
173. Penco, S., Caligo, M. A., Cipollini, G., Bevilacqua, G., & Garre, C. (1999). Lactoferrin expression in human breast cancer. *Cancer biochemistry biophysics*, 17(1-2), 163-178. PMID: 10738912
174. Suzuki YA, Lopez V, Lonnertial B. Mammalian lactoffer-in receptors: structure and function. *Cel Mol Life Sci* 2005; 62: 2560–75.

Додаток А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар Рівненського
обласного онкологічного диспансеру

Г.І. МАКСИМ'ЯК

А К Т В П Р О В А Д Ж Е Н Н Я

1. Назва розробки: «Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози» в рамках виконання НТР "Розробка та впровадження прогностичної панелі біомаркерів раку молочної залози для персоналізованого моніторингу перебігу пухлинного процесу" (тема за договором №2.2.5.406 від 01.04.2016 р.)

(найменування пропозиції щодо впровадження)

2. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, відділ моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії

Поштова адреса: 03022 м. Київ, вул. Васильківська, 45

Керівник розробки – академік НАН України, д.мед.н., професор Чехун В.Ф.

Відповідальні виконавці: д.б.н. Лук'янова Н.Ю., к.б.н. Шепеленко І.В., к.мед.н. Чехун С.В., Борікун Т.В., Собченко С.О., Ключов О.М.

(заклад-розробник, поштова адреса, ПІБ авторів)

3. Джерело інформації: Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози. Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 191–2016. – Київ, 2016. – 4 с.

(назва, вид надання методичних рекомендацій, інформаційні листи, вихідні дані статті/монографії)

4. Впроваджено: відділення пухлин молочної залози, голови та шиї Рівненського обласного онкологічного диспансеру, 33000, м. Рівне, вул. Олександра Олеся, 12, тел. 38(0362)225004

(найменування ЛПУ, адреса, відділення, де проводилось впровадження)

5. Терміни впровадження: 09.08.2016 р. – 31.12.2016 р.

6. Загальна кількість спостережень – 32 пацієнтки

7. Результат використання пропозицій (кількість спостережень):

позитивний _____ (100%) 32 пацієнтки

невизначений _____

негативний _____

8. Ефективність впровадження.

Аналіз мікроРНК в пухлинній тканині хворих на рак молочної залози – це кількісний, високоінформативний, достатньо швидкий спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин молочної залози.

9. Зауваження, пропозиції:

Використання зазначених пропозицій дозволяє удосконалити якість прогнозування перебігу раку молочної залози та підбору тактики лікування хворих на засадах індивідуалізованої терапії.

“29” грудня 2016 р.

Відповідальний за впровадження:
Зав. відділення пухлин молочної залози,
голови та шиї
П.М. Якимчук



ПТВЕРДЖУЮ»

Івано-Франківського обласного
клінічного онкологічного диспансеру

В.Р. РОМАНЧУК

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва розробки: «Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози» в рамках виконання НТР "Розробка та впровадження прогностичної панелі біомаркерів раку молочної залози для персоналізованого моніторингу перебігу пухлинного процесу" (тема за договором №2.2.5.406 від 01.04.2016 р.)

(найменування пропозиції щодо впровадження)

2. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, відділ моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії

Поштова адреса: 03022 м. Київ, вул. Васильківська, 45

Керівник розробки – академік НАН України, д.мед.н., професор Чехун В.Ф.

Відповідальні виконавці: д.б.н. Лук'янова Н.Ю., к.б.н. Шепеленко І.В., к.мед.н. Чехун С.В.,

Борікун Т.В., Собченко С.О., Ключов О.М.

(заклад-розробник, поштова адреса, ПІБ авторів)

3. Джерело інформації: Спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин у хворих на рак молочної залози. Інформаційний лист про нововведення в сфері охорони здоров'я № 191-2016. – Київ, 2016. – 4 с.

(назва, вид надання методичних рекомендацій, інформаційні листи, вихідні дані статті/монографії)

4. Впроваджено: клінічний мамологічний центр з урологією Івано-Франківського обласного клінічного онкологічного диспансеру, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Медична 17, тел. 38(0342)502269

(найменування ЛПУ, адреса, відділення, де проводилось впровадження)

5. Терміни впровадження: 09.08.2016 р. – 31.12.2016 р.

6. Загальна кількість спостережень – 23 хворих

7. Результат використання пропозицій (кількість спостережень):

позитивний (100%) 23 хворих

невизначений —

негативний —

8. Ефективність впровадження.

Аналіз мікроРНК в пухлинній тканині хворих на рак молочної залози – це кількісний, високоінформативний, достатньо швидкий спосіб визначення ступеня злоякісності пухлин молочної залози.

9. Зауваження, пропозиції:

Використання зазначених пропозицій дозволяє удосконалити якість прогнозування перебігу раку молочної залози та підбору тактики лікування хворих на засадах індивідуалізованої терапії.

.. 28 грудня 2016 р.

Відповідальний за впровадження:

Зав. клініко-мамологічним центром з урологією

к.мед.н. В.А. Живецький



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар
Прикарпатського клінічного онкологічного центру

В.Р. РОМАНЧУК

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Спосіб персоналізованого прогнозу агресивності перебігу раку молочної залози
(найменування пропозиції для впровадження)
2. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45;
Київський міський клінічний онкологічний центр, 03115, м. Київ, вул. Верховинна, 69.
Н.Ю. Лук'янова, Л.А. Налескіна, Д.М. Сторчай, С.О. Собченко, О.М. Ключов, В.Ф. Чехун.
(установа-розробник, її поштова адреса, П.І.Б.)
3. Джерело інформації: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я
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. -
Київ. – 2018. – № 354-201. – 6 с.
4. Впроваджено: в 2018 р. мамологічне відділення Прикарпатського клінічного онкологічного центру.
5. Строки впровадження: з 05.05.2018 р. по 15.12.2018 р.
6. Загальна кількість спостережень: 42 хворі.
7. Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

Показники ефективності	За даними	
	розробників	організації, що впроваджує
Клінічні показники:		
покращення безпосередніх результатів лікування:		
- підвищення якості прогнозування перебігу	на 16%	на 13%
- збільшення показників безрецидивної виживаності	на 13%	на 10%
Соціальні:		
- покращання якості життя хворого	на 13%	на 10%

8. Зауваження, пропозиції: Використання способу дозволяє отримувати високоточний прогноз клінічного перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози та проводити своєчасну корекцію лікувальної тактики.

„___” _____ 2018 р.

Відповідальний за впровадження:
Зав. мамологічним відділенням

Ю.В. Стинський

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Головний лікар Київського
міського онкологічного центру

О.М. КЛЮСОВ

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Спосіб персоналізованого прогнозу агресивності перебігу раку молочної залози
(найменування пропозиції для впровадження)

2. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 45;
Київський міський клінічний онкологічний центр, 03115, м. Київ, вул. Верховинна, 69.
Н.Ю. Лук'янова, Л.А. Налескіна, Д.М. Сторчай, С.О. Собченко, О.М. Ключов, В.Ф. Чехун.
(установа-розробник, її поштова адреса, П.І.Б.)

3. Джерело інформації: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я
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. –
Київ, 2018. – № 354-2018. – 6 с.

4. Впроваджено: в 2017-2018 рр. хірургічне відділення Київського міського онкологічного центру.

5. Строки впровадження: з 05.01.2017 р. по 01.12.2018 р.

6. Загальна кількість спостережень: 89 хворих.

7. Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

Показники ефективності	За даними	
	розробників	організації, що впроваджує
Клінічні показники:		
покращення безпосередніх результатів лікування:		
- підвищення якості прогнозування перебігу	на 16%	на 15%
- збільшення показників безрецидивної виживаності	на 13%	на 10%
Соціальні:		
- покращання якості життя хворого	на 13%	на 12%

8. Зауваження, пропозиції: Використання пропозицій дозволяє забезпечити високоточний прогноз клінічного перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози та проводити своєчасну відповідну корекцію лікувальної тактики.

„___” _____ 2018 р.

Відповідальний за впровадження:

Лікар хірург-онколог

С.О. Собченко

Додаток Б

Список публікацій здобувача

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., Chepurnaty 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. - P. 51-85..
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 vaying degrees of malignamcy and sensitivity of cytostatics // Experimental Oncology. – 2015. – V. 37, N 3. – P. 181-186.
3. 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.
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.
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-

6. Ключов А.Н., Аникусько Н.Ф., Любота И.И., Савчук С.А., Катеринич А.А., Нейман А.М., Малец М.С., Собченко С.А., Долинский 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.
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.
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.
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.
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.
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.

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. Налєскіна 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. Лук'янова 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. - Евразийський онкологічний журнал. - Т. 2, No 4. - С. 306.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. Науково-практична конференція “Персоніфікація лікування гормонозалежних пухлин” (Яремче, 15-16 жовтня 2015 р) – постерна доповідь.
2. XIII з’їзд онкологів та радіологів України (Київ, 26-28 травня 2016) – усна доповідь.
3. XIII з’їзд онкологів та радіологів України (Київ, 26-28 травня 2016) – постерна доповідь.
4. IX Съезд онкологов и радиологов стран СНГ и Евразии (Минск 15-17 июня 2016) – постерна доповідь.