

Національна академія наук України  
Міністерство охорони здоров'я України

**КОЛАГЕНИ ЯК ПРЕДИКТИВНІ МАРКЕРИ ЕФЕКТИВНОСТІ  
ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ  
ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ МОЛОДОГО ВІКУ**

**(методичні рекомендації)**

Київ – 2023

Національна академія наук України  
Міністерство охорони здоров'я України



**КОЛАГЕНИ ЯК ПРЕДИКТИВНІ МАРКЕРИ ЕФЕКТИВНОСТІ  
ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ  
ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ МОЛОДОГО ВІКУ**

**(методичні рекомендації)**

Київ – 2023

**Установа-розробник:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

**Установа-співрозробник:**

Івано-Франківський національний медичний університет МОЗ України

**Укладачі:**

|                                                                |                 |
|----------------------------------------------------------------|-----------------|
| Чехун Василь Федорович,<br>д. мед. н., професор, академік НАНУ | (044) 259-01-83 |
| Лук'янова Наталія Юріївна, д. б. н. , ст. д.                   | (044) 257-96-44 |
| Кашуба Олена Віталіївна, д. б. н.                              | (044) 257-96-44 |
| Борікун Тетяна Вікторівна, к. б. н.                            | (044) 257-96-44 |
| Задворний Тарас Володимирович, к. б. н.                        | (044) 257-96-44 |
| Базась Володимир Миколайович, к. мед. н. .                     | (044) 257-96-44 |
| Павлова Анна Олександрівна                                     | (044) 257-96-44 |
| Мушій Олександр Михайлович                                     | (044) 257-96-44 |
| Шепеленко Ірина Віталіївна, к. б. н.                           | (044) 257-96-44 |
| Тодор Ігор Миколайович, д. б. н., с. н. с.                     | (044) 257-96-44 |
| Крижанівська Анна Євстахіївна, д. мед. н., професор            | (034) 250-73-55 |
| Дяків Ірина Богданівна, к. мед. н.                             | (034) 250-73-55 |
| Андріїв Аліна Володимирівна, к. мед. н.                        | (034) 250-73-55 |

**Рецензент:**

**Литвиненко Олександр Олександрович**, д. мед. н., професор, завідувач відділу радіоіндукованих онкологічних захворювань, ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України»

**Рекомендовано:**

Вченою радою Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (протокол № 12 від 13 грудня 2023 р.)

Вченою радою Івано-Франківського національного медичного університету МОЗ України (протокол № 18 від 26 грудня 2023 р.)

## ЗМІСТ

|                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ -----                                                                                                                                                                                  | 5  |
| ВСТУП-----                                                                                                                                                                                                       | 6  |
| Неклітинні компоненти стромального мікрооточення, як прогностичні<br>молекулярно-біологічні маркери раку молочної залози -----                                                                                   | 9  |
| Клінічна характеристика хворих -----                                                                                                                                                                             | 11 |
| Протокол дослідження профілю експресії колагенів на рівні білка для<br>прогнозування ефективності неоад'ювантної поліхіміотерапії у хворих на рак<br>молочної залози молодого віку методом імуногістохімії ----- | 13 |
| Зв'язок рівнів експресії колагенів у тканині раку молочної залози хворих<br>молодого віку з чутливістю до неоад'ювантної хіміотерапії -----                                                                      | 16 |
| ВИСНОВКИ -----                                                                                                                                                                                                   | 20 |
| ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ -----                                                                                                                                                                          | 21 |

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

|          |   |                                                |
|----------|---|------------------------------------------------|
| PMЗ      | — | рак молочної залози                            |
| НПХТ     | — | неoad'ювантна поліхіміотерапія                 |
| COL1A1   | — | колаген І типу                                 |
| COL3A1   | — | колаген ІІІ типу                               |
| COL12A1  | — | колаген ХІІ типу                               |
| MMP-1    | — | матриксна металопротеїназа 1                   |
| MMP-8    | — | матриксна металопротеїназа 8                   |
| PE       | — | рецептор естрогену                             |
| PP       | — | рецептор прогестерону                          |
| Her2/neu | — | рецептор епідермального фактору росту людини 2 |

## ВСТУП

У світі щорічно реєструється більше 1 млн. нових випадків злоякісних новоутворень молочної залози. Згідно з даними GLOBOCAN за 2021 рік приблизно у 2,1 млн жінок діагностовано рак молочної залози (РМЗ), що становить 11,6% загальної кількості злоякісних новоутворень. Згідно даних Національного канцер-реєстру України у 2021 році виявлено близько 13 тис. випадків цієї нозологічної форми раку, що становить понад 13% від загального числа діагностованих випадків злоякісних новоутворень. За показником захворюваності на 100 тис. жіночого населення РМЗ зберігає сталу тенденцію до щорічного зростання. З 2013 до 2022 рік щорічний приріст складає 3,3%. Найвищу захворюваність жінок зареєстровано у віковій групі 50–59 років, смертність — у віковій групі 80–84 роки.

Статистичні дані останніх десятирічь також свідчить про неухильне зростання показників захворюваності на РМЗ серед жінок молодого віку, який посідає перше місце у структурі захворюваності пацієнток віком 18-29 років та є однією із провідних причин смертності у віковому діапазоні 15-39 років. Відомо, що рак у пацієнток молодого віку відрізняється від такого в осіб літнього віку за агресивністю клінічного перебігу, гістологічною будовою та молекулярним профілем. Уже у віковій групі 18–24 роки РМЗ займає третє місце у структурі захворюваності українок (10,8%), а з 30 до 74 років – перше (27,6–20,6%). У структурі смертності жіночого населення від раку РМЗ переважає у вікових групах 30–54, 55–74 та 75+ років і складає 24,5%, 20,6% та 18,5%, відповідно.

З огляду на це, пошук факторів, які б дозволити спрогнозувати агресивний потенціал та здійснити оцінку ефективності медикаментозного лікування з урахуванням біологічних особливостей пухлинних клітин, є пріоритетним напрямком досліджень.

На даний час основні методи лікування РМЗ включають хірургію, хіміотерапію, променеву та таргетну терапію. З огляду на те, що в останні роки

РМЗ розглядається як системне захворювання, неоад'ювантна поліхіміотерапія (НПХТ) стала невід'ємною складовою лікування цієї онкопатології. НПХТ зазвичай застосовують для лікування пацієнтів з місцево поширеними формами РМЗ, а також при неоперабельних випадках. Найчастіше, згідно протоколів лікування хворих на РМЗ, призначають схеми АС і САФ, до складу яких входять антрацикліни (здебільшого, доксорубіцин) та циклофосфамід. Проте, незважаючи на тривалу клінічну практику застосування НПХТ, досі залишаються не визначені оптимальні препарати та режими хіміотерапії, особливо у жінок молодого віку, ключовим фактором лікування яких є мінімізація побічних ефектів та збереженням репродуктивної функції.

Окрім того, дані клінічних досліджень демонструють значну гетерогенність відповіді на НПХТ у хворих на РМЗ молодого віку та швидкий розвиток резистентності, що є однією з основних причин її неефективності, що пов'язано з відсутністю надійних маркерів для прогнозування чутливості до медикаментозного лікування. У клінічній практиці для оцінки терапевтичного ефекту НПХТ прийнято застосовувати класичні морфологічні методики зафарбовування гістологічних препаратів гематоксиліном та еозином, а також опис ефективності за класифікаціями RECIST 1.1. та Лавнікової. Проте, таку оцінку проводять безпосередньо після лікування та операційного втручання. Відомими способами визначення чутливості РМЗ до НПХТ також є імуногістохімічне дослідження показників експресії рецепторів стероїдних гормонів, білків-регуляторів апоптозу та проліферації, а також маркерів медикаментозної резистентності у пухлинній тканині. Основним недоліком використання зазначених методик є їх суб'єктивність, оскільки застосування такого підходу дозволяє здійснювати прогнозування ефективності НПХТ на підставі оцінки експресії молекулярних маркерів лише у пухлинних клітинах без урахування особливостей стромального мікрооточення пухлинного вогнища. Останніми роками остаточно доведено, що важлива роль у формуванні медикаментозної резистентності багатьох новоутворень, в тому числі РМЗ,

належить пухлинному мікрооточенню. Це пов'язано з тим, що механізми дії протипухлинних препаратів обумовлені не лише пошкодженням злоякісно трансформованих клітин, але й елементів стромального мікрооточення. В той же час, існуючі відомості щодо зв'язку окремих елементів мікрооточення РМЗ у жінок молодого віку з клінічною ефективністю медикаментозної терапії є суперечливими та потребують систематизації.

Застосування запропонованого комплексного підходу до оцінки ключових компонентів стромального мікрооточення дозволить оптимізувати комплексне лікування хворих на РМЗ молодого віку, що сприятиме значному поліпшенню якості життя та зниженню інвалідизації цієї категорії пацієнтів.

Методичні рекомендації розроблено за результатами досліджень, виконаних у межах НТР «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» ДОГОВІР № ДЗ /135-2022 р. від 21 жовтня 2022 р. на виконання науково-технічної роботи за державним замовленням на науково-технічні (експериментальні) розробки та науково-технічну продукцію (2022-2023, № Держреєстрації 0122U201203).

Представлені рекомендації розраховані на онкомамологів та патогістологів, що займаються діагностикою, лікуванням та оцінкою терапевтичного ефекту НПХТ у хворих на РМЗ молодого віку.

Методичні рекомендації із зазначеним спектром стромальних фібрилярних білків, запропонованих в якості критеріїв прогнозування ефективності лікування хворих на РМЗ молодого віку, видаються в Україні вперше.



## **Неклітинні компоненти стромального мікрооточення, як прогностичні молекулярно-біологічні маркери раку молочної залози**

Характерною ознакою РМЗ хворих молодого віку є низький відсоток строми та високі показники пухлинно-стромального співвідношення порівняно із жінками старшого віку. Остаточно доведено, що стромальне мікрооточення пухлинного вогнища є складною та динамічною структурою, хімічні та біофізичні властивості якої впливають на клітинну адгезію, проліферацію та міграцію, що обумовлює агресивність перебігу пухлинного процесу.

Найменш дослідженими при пухлинній прогресії є неклітинні елементи мікрооточення, в тому числі колаген, який формує щільну тривимірну сітку із сплєтених між собою волокнистих структур та є найпоширенішим фібрилярним білком в організмі. Зміни співвідношення та просторової структури колагену розглядаються як ключовий діагностичний і прогностичний фактор, асоційований із виникненням та прогресією багатьох злоякісних новоутворень, включно з РМЗ.

Класичним методом дослідження стану строми з використанням світлової мікроскопії є зафарбування зрізів пухлинної тканини гематоксиліном і еозином. Проте дослідження окремих волокон у складі стромального компоненту потребують використання більш складних методик зафарбування та специфічного аналізу отриманих гістологічних мікрофотографій. Дослідження морфометричних параметрів на сьогодні переважно здійснюються із використанням методу SHG мікроскопії. В основі цього методу лежить уловлення мікроскопом так званих хвиль second-harmonic light, які виникають при дії на тканинний зріз джерела світла. Іншим способом візуалізації колагену в складі тканини новоутворення є застосування поляризаційної мікроскопії.

Ідентифіковано близько 30 різних типів колагенів, які за функціональною активністю поділяють на 4 групи: фібрилярні, фібрил-асоційовані, сіткоутворюючі колагени, а також білки, що входять до складу базальної

мембрани.

Основним компонентом екстрацелюлярного матриксу, на який припадає близько 95% від загальної маси колагенів у стромі РМЗ, є колаген I типу (COL1A1). Будучи основною структурною складовою позаклітинного матриксу, фібрили COL1A1 впливають на механічну міцність тканин і органів. Кожна молекула COL1A1 складається із поліпептидних ланцюгів. Гомотримерні форми COL1A1 зазвичай зустрічаються у фіброзних ураженнях, тканинах плоду та деяких пухлинах, зокрема РМЗ. Як правило, COL1A1 вважається високо стійким до протеолітичної деградації. Проте, деякі протеази, такі як MMP-1 (інтерстиціальна колагеназа) і MMP-8 (колагеназа нейтрофілів), мають здатність розщеплювати COL1A1 протеолітично.

Колаген III типу (COL3A1) є важливим структурним білком (близько 5-20% від усього вмісту колагену в організмі людини) і класифікований як один із основних фібрилярних колагенів. COL3A1 є ключовим структурним компонентом у порожнистих органах, таких як великі кровоносні судини, матка та кишечник. Інші функції COL3A1 включають взаємодію з тромбоцитами в каскаді згортання крові, а також це важлива сигнальна молекула в процесах загоєння та регенерації. У випадку РМЗ достовірно відомо про участь цього типу колагену у стимуляції проліферації, інвазії, міграційної активності, а також здатності злоякіснотрансформованих клітин до імунної втечі.

Колаген XII типу (COL12A1) належить до родини колагенів, асоційованих з фібрилами, тому в позаклітинному просторі переважно взаємодіє із COL1A1 та COL2A1, а також нефібрилярними матрицелюлярними протеїнами екстрацелюлярного матриксу. COL12A1 виконує функцію посередника у взаємодії між фібрилами та навколишньою стромою. Останнім часом встановлена ключова роль COL12A1 у патогенезі новоутворень органів шлунково-кишкового тракту, ендометрію та молочної залози. Підвищення експресії цього білка пов'язують із посиленням міграції трансформованих клітин та метастатичними процесами. Підвищення рівня COL12A1 визначено у

клітинних лініях раку яєчників, резистентних до цисплатину та доксорубіцину. Крім того, експресія COL12A1 тісно пов'язана з протипухлинним імунітетом/імунотерапією. COL12A1 позитивно корелює з великою кількістю макрофагів M0 і M2 у більш ніж шести типах пухлин і демонструє значну диференціальну експресію між пацієнтами, чутливими та не чутливими до хіміотерапії.

Відповідно до відомих на сьогодні даних щодо ролі стромального мікрооточення у розвитку та прогресуванні РМЗ, а також на основі результатів власних досліджень нами розроблено рекомендації з використання показників топології експресії колагену, асоційованих з молодим віком, для прогнозування ефективності НПХТ.

### **Клінічна характеристика хворих**

Ретроспективне дослідження профілю експресії колагенів для прогнозування ефективності НПХТ проведено на зразках пухлинної тканини 130 хворих на РМЗ молодого віку (згідно класифікації ВООЗ 2015 року), які проходили лікування у Комунальному некомерційному підприємстві «Прикарпатський клінічний онкологічний центр Івано-Франківської обласної ради» протягом 2017-2021 років і дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях.

Всіх хворих обстежено з використанням загальноприйнятих клініко-лабораторних методів відповідно до Стандартів діагностики та лікування онкологічних хворих, затверджених Наказом МОЗ України № 396 від 30.06.2015 р. (реєстровий номер ГС 2015-396). Всі пацієнтки отримували хіміотерапію у неoad'ювантному режимі за стандартною схемою 4АС щотижнево.

Загальна клінічна характеристика хворих представлена у Табл. 1.

**Таблиця 1. Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ II-III стадій**

| Показники                                          | Кількість хворих |      |
|----------------------------------------------------|------------------|------|
|                                                    | n                | %    |
| Загальна кількість хворих                          | 130              | 100  |
| Середній вік, роки                                 | 35,2±4,1         |      |
| Коливання віку, роки                               | 24-44            |      |
| Репродуктивний статус                              |                  |      |
| Менструальний цикл збережений                      | 98               | 75,4 |
| Менопауза                                          | 32               | 24,6 |
| Стадія                                             |                  |      |
| II                                                 | 89               | 68,5 |
| III                                                | 41               | 31,5 |
| Наявність метастазів у регіонарні лімфатичні вузли |                  |      |
| N0                                                 | 74               | 56,9 |
| N1-3                                               | 56               | 43,1 |
| Гістологічний підтип                               |                  |      |
| Інфільтративна протокова аденокарцинома            | 92               | 70,7 |
| Інфільтративна долькова аденокарцинома             | 38               | 29,3 |
| Ступінь диференціювання                            |                  |      |
| Ступінь диференціювання G1 (високий)               | 17               | 13,1 |
| Ступінь диференціювання G2 (помірний)              | 98               | 75,3 |
| Ступінь диференціювання G3 (низький)               | 15               | 11,6 |
| Молекулярний підтип                                |                  |      |
| Люмінальний А                                      | 51               | 39,9 |
| Люмінальний Б                                      | 43               | 33,1 |
| Базальний                                          | 18               | 13,9 |
| HER2/neu-позитивний                                | 17               | 13,1 |

В залежності від ступеня вираженості клінічного ефекту неоад'ювантного лікування проведено розподіл пацієнтів згідно критеріїв RECIST 1.1. (Табл. 2).

**Таблиця 2. Розподіл хворих на РМЗ молодого віку з урахуванням клінічного ефекту НХПТ за критеріями RECIST 1.1**

| Клінічна оцінка НХПТ<br>(за критеріями RECIST 1.1) |                   | Кількість хворих n=130/100% |      |
|----------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------|------|
|                                                    |                   | n                           | %    |
| Чутливі пухлини                                    | Повна регресія    | 12                          | 9,2  |
|                                                    | Часткова регресія | 79                          | 60,7 |
| Резистентні пухлини                                | Стабілізація      | 23                          | 17,7 |
|                                                    | Прогресування     | 16                          | 12,4 |

За ступенем лікувального патоморфозу за Лавніковою виділяють наступні групи: I ступінь — понад 50% пухлинної паренхіми збережено; II ступінь —

збережено 20–50% пухлинної паренхіми; III ступінь — до 20% пухлинної паренхіми збереглися у вигляді окремих вогнищ; IV ступінь — повна відсутність пухлинної паренхіми. У Табл. 3. представлено розподіл вибірки хворих за Лавніковою.

**Таблиця 3. Розподіл хворих на РМЗ молодого віку з урахуванням ступеня лікувального патоморфозу за Лавніковою після НПХТ**

| Клінічна оцінка НПХТ |     | Кількість хворих, n=130/100% |      |
|----------------------|-----|------------------------------|------|
|                      |     | n                            | %    |
| Чутливі пухлини      | IV  | 11                           | 8,4  |
|                      | III | 84                           | 64,6 |
| Резистентні пухлини  | II  | 19                           | 14,6 |
|                      | I   | 16                           | 12,4 |

**Протокол дослідження профілю експресії колагенів на рівні білка для прогнозування ефективності неоад'ювантної поліхіміотерапії у хворих на рак молочної залози молодого віку методом імуногістохімії**

Існуючі на сьогодні способи оцінки імуногістохімічного дослідження експресії молекулярно-біологічних маркерів ґрунтується зазвичай на застосуванні напівкількісних методик (H-score) та залучення спеціалістів до безпосереднього аналізу гістологічних препаратів. Це, в свою чергу, створює ряд проблем із інтерпретацією отриманих результатів та імплементацією їх у клінічну практику. Проведення запропонованого нами автоматизованого аналізу гістологічних препаратів дозволяє зменшити імовірність похибки та кількісно оцінити рівень експресії маркера в тканині новоутворення.

Однак слід зазначити, що для проведення такого аналізу необхідним є залучення комп'ютерних програм ImageJ, а саме плагіну IHC profiler.

**Опис методики**

1. Виготовлення гістологічних зрізів проводили на ротаційному санному

мікротомі AMOS AMR400 (Австралія). Товщина зрізів складала 5-6 мкм. Свіжі зрізи поміщали на нагріту до  $t +37^{\circ}\text{C}$  водяну баню задля покращення їх розправлення, після чого поміщали на предметне скло і підсушували на термостолику за температури  $t +56^{\circ}\text{C}$  впродовж години.

2. Після просушування, задля депарафінізації тканини, скельця проводили через 2 розчини ксилолу (із експозицією по 20 хв в кожному) із наступною промивкою в 2 розчинах 96% етилового спирту (із експозицією по 20 хв в кожному). Надалі скельця промивали у двох порціях дистильованої води по 3 хв.

3. Демаскування антигенів проводили шляхом обробки зрізів в ЕДТА буфері (рН 8,0) на водяній бані протягом 15 хв з подальшим охолодженням при кімнатній температурі та промиванням у 3-х порціях дистильованої води по 2 хв.

4. Блокування ендогенної пероксидази з використанням Hydrogen Peroxidase Block проводили протягом 10 хв при кімнатній температурі, надалі промивали у буфері Tween 20 (рН 7,6).

5. Блокування неспецифічних білків здійснювали шляхом інкубації зрізів у присутності Protein Block протягом 5 хв при кімнатній температурі.

6. У пухлинній тканині досліджували експресію колагенів шляхом застосування відповідних моноклональних антитіл (Табл. 4). Інкубацію з даними антитілами в розведенні відповідно до рекомендацій виробника проводили впродовж 1 год. Після цього скельця зі зрізами ретельно промивали у буфері Tween 20 (рН 7,6) для видалення залишків реагенту.

**Таблиця 4. Список використаних антитіл при імуногістохімічному аналізі**

| Назва матеріалу або реактиву | Виробник            | Розведення | Кат. №/Лот/ Клон |
|------------------------------|---------------------|------------|------------------|
| COL1A1                       | MyBioSource, Канада | 1:400      | 1B2              |
| COL3A1                       | MyBioSource, Канада | 1:350      | 5G2              |
| COL12A1                      | abcam, США          | 1:300      | ab121304         |

7. Для візуалізації білка надалі використовували Primary Antibody Enhancer,

що наносили, і залишали на зрізах при кімнатній температурі на 30 хв, після чого промивали в Tween 20 (pH 7,6).

8. Забарвлення білка здійснювали за допомогою хромогену для пероксидази хрому (HRP Polymer) – 3,3'-діамінобензидину тетрахлориду.

9. В якості негативного контролю на зріз наносили усі реагенти, передбачені тест системою, окрім первинних антитіл до досліджуваних білків. Замість цього на етапі нанесення первинного антитіла на зрізи наносили фізіологічний розчин.

10. Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном Гілла протягом 1,5-2 хв.

11. Після фарбування тканина дегідратовалася в 2-х порціях 96% етилового спирту (із експозицією по 20 хв в кожному) та просвітлювалася в 2-х розчинах ксилолу (із експозицією по 20 хв в кожному).

12. Фінальний етап – це заключення просвітлених зрізів до бальзаму задля подальшого зберігання мікропрепаратів та їх аналізу за допомогою мікроскопії.

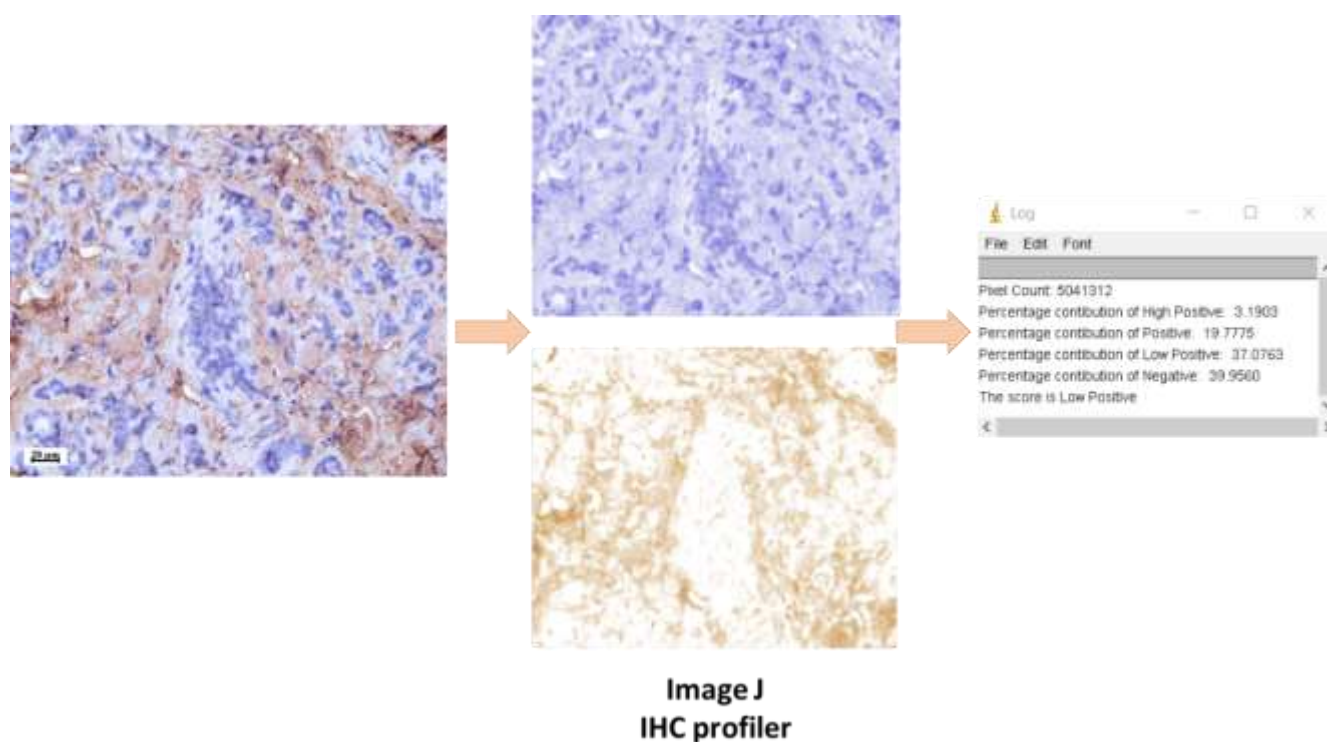
13. Для кількісної оцінки експресії колагенів при імуногістохімічному дослідженні використовували плагін ІНС profiler програми Image J. Для цього гістологічні зразки попередньо фотографували в кількості мінімум 10 полів зору на кожен.

Принцип роботи плагіну ІНС profiler полягає в розділенні мікрофотографії на неспецифічне забарвлення гематоксиліном та специфічну візуалізацію мітки 3,3'-діамінобензидином тетрахлориду. Після цього, отриманий шар специфічного забарвлення колагенів аналізують за інтенсивністю свічення попиксельно. Усі пікселі на мікрофотографіях розподіляють на 4 групи:

- відносна кількість пікселів із високо позитивною експресією
- відносна кількість пікселів із позитивною експресією
- відносна кількість пікселів із низько позитивною експресією
- відносна кількість пікселів без експресії.

Із застосуванням формули (Рис. 1Б) далі проводять обрахунок Індексу оптичної щільності колагену (в межах від 1 до 4 умовних одиниць), який і є кількісним показником експресії досліджуваного маркеру. Програма здатна

повністю автономно аналізувати мікрофотографії та видавати результати інтенсивності експресії.



**А**

Індекс оптичної щільності

$$= \left( \frac{\begin{aligned} &\text{Відносна кількість пікселів з високо позитивною експресією} \times 4 \\ &+ \text{Відносна кількість пікселів з позитивною експресією} \times 3 \\ &+ \text{Відносна кількість пікселів з низько позитивною експресією} \times 2 \\ &+ \text{Відносна кількість пікселів без експресії} \times 1 \end{aligned}}{100} \right)$$

**Б**

**Рис. 1.** Алгоритм роботи плагіну ImageJ IHC profiler (А) та формула розрахунку індексу оптичної щільності (Б) для оцінки експресії колагенів у тканині РМЗ

### **Зв'язок рівнів експресії колагенів у тканині раку молочної залози хворих молодого віку з чутливістю до неoad'ювантної хіміотерапії**

Проведено дослідження зв'язку експресії колагенів у тканині РМЗ хворих віком до 44 років залежно від чутливості до НПХТ (Рис. 2). Виявлено, що новоутворення, чутливі до НПТХ за схемою 4АС за системою RECIST 1.1, мали

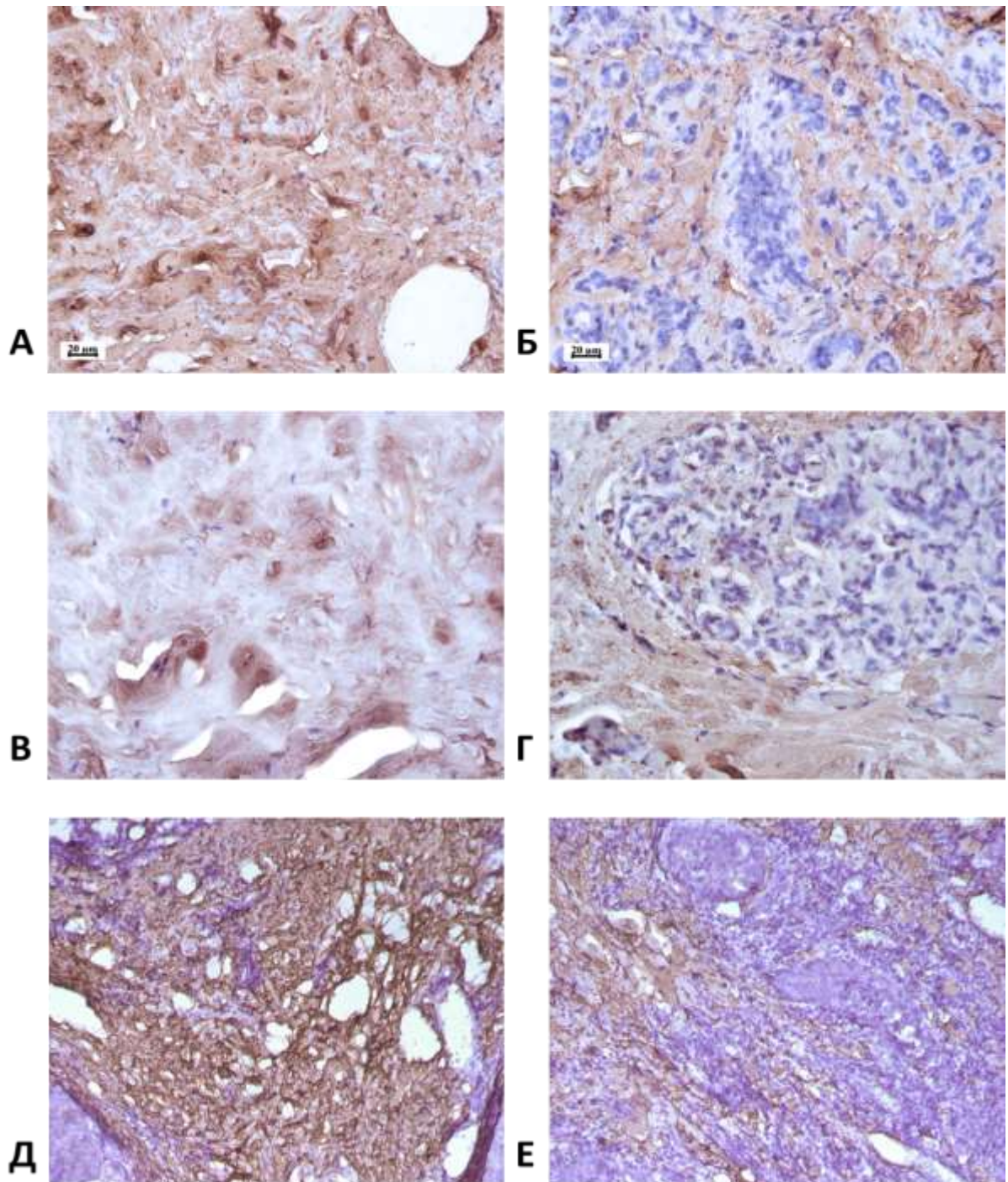


достовірно нижчі показники експресії COL1A1 ( $1,487 \pm 0,03124$  у.о.) та COL12A1 ( $1,267 \pm 0,01010$  у.о.), а також вищі значення оптичної щільності стромального COL3A1 ( $1,355 \pm 0,02243$  у.о.) (Табл. 5) порівняно з резистентними до терапії пухлинами. При оцінці терапевтичного ефекту за Лавніковою встановлено достовірно вищі рівні експресії COL1A1 ( $1,586 \pm 0,02137$  у.о.) та COL12A1 ( $1,356 \pm 0,01479$  у.о.) в резистентних новоутвореннях, порівняно з тканиною РМЗ, чутливою до НПХТ за схемою 4АС ( $1,405 \pm 0,02926$  у.о. та  $1,268 \pm 0,009965$  у.о. відповідно).

**Таблиця 5. Експресія колагенів у тканині хворих на РМЗ молодого віку залежно від клінічного ефекту НПХТ**

| Чутливість до НПХТ                             |                                          | Експресія колагенів на рівні білка |                       |                        |
|------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                                |                                          | COL1A1<br>(у.о.)                   | COL3A1<br>(у.о.)      | COL12A1<br>(у.о.)      |
| RECIST 1.1                                     | Чутливі (Повна або часткова регресія)    | <b>1,487±0,03124</b>               | <b>1,355±0,02243</b>  | <b>1,267±0,01010</b>   |
|                                                | Резистентні (Стабілізація або прогресія) | <b>1,608±0,02659*</b>              | <b>1,297±0,01669*</b> | <b>1,364±0,01556*</b>  |
| Ступінь лікувального патоморфозу за Лавніковою | Чутливі (III- IV)                        | <b>1,405±0,02926</b>               | $1,303 \pm 0,02081$   | <b>1,268±0,009965*</b> |
|                                                | Резистентні (I- II)                      | <b>1,586±0,02137*</b>              | $1,319 \pm 0,01666$   | <b>1,356±0,01479*</b>  |

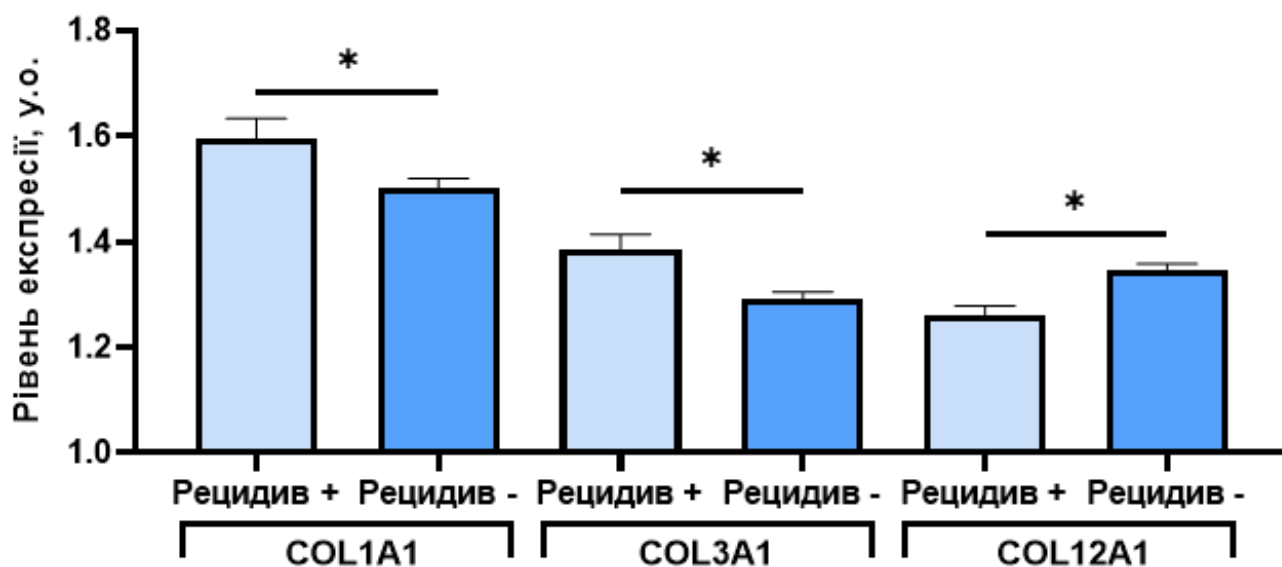
Примітка: \* –  $p < 0,001$  у резистентних до НПХТ новоутвореннях, порівняно із тканиною пухлин, чутливих до терапії.



**Рис. 2.** Експресія COL1A1 (А-Б), COL3A1 (В-Г) та COL12A1 (Д-Е) у тканині РМЗ хворих молодого віку, що отримували НПХТ за схемою 4АС. Імуногістохімічний метод, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлориду. Дофарбування гематоксиліном.  $\times 400$ .

При оцінці експресії генів колагенів залежно від статусу рецидиву встановлено, що тканина новоутворень молочної залози хворих із діагностованим впродовж 3 років рецидивом РМЗ мала достовірно нижчі

значення оптичної щільності COL12A1 ( $1,261 \pm 0,01786$  у.о.,  $p < 0,0087$ ), а також вищі показники щільності COL1A1 ( $1,595 \pm 0,03841$  у.о.,  $p < 0,025$ ) та COL3A1 ( $1,386 \pm 0,02824$ ,  $p < 0,0008$ ). В той час як експресія COL1A1, COL3A1 та COL12A1 у пухлинній тканині пацієнток без розвитку рецидиву була на рівні  $1,502 \pm 0,01895$  у.о.,  $1,292 \pm 0,01367$  у.о. та  $1,346 \pm 0,01205$  у.о., відповідно (Рис. 3).



**Рис. 3.** Зв'язок експресії колагенів у тканині пацієнток молодого віку із рецидивом РМЗ після проведення курсу НПХТ за схемою 4АС

Отже, для резистентних до НПХТ за схемою 4АС новоутворень молочної залози характерним є підвищення експресії стромальних COL1A1 та COL12A1 та зниження експресії COL12A1. Крім того, доведено зв'язок високої експресії COL1A1 та COL3A1, а також низької експресії COL12A1 в хворих на РМЗ молодого віку із діагностованим впродовж 36 місяців рецидивом захворювання.

Застосування колагенів в якості предиктивних маркерів ефективності хіміотерапевтичного лікування пацієнток молодого віку, хворих на РМЗ, призведе як до підвищення ефективності безпосередніх результатів лікування, що згідно оцінки регресії новоутворень за шкалою ВООЗ становить 17%, та зростання показника клінічної регресії на 10%, а також покращення одного з соціальних показників, а саме: – якості життя пацієнток на 13%.

## ВИСНОВКИ

1. Запропонований набір предиктивних маркерів, що входять до складу фібрилярного неклітинного компоненту мікрооточення, забезпечує високоспецифічну та точну оцінку чутливості новоутворень молочної залози до НПХТ за схемою 4АС у хворих молодого віку і, таким чином, надає можливість проводити персоналізовану корекцію схем терапії із урахуванням вікових особливостей та репродуктивного статусу пацієнток з метою покращення ефективності терапії та зменшення частоти ускладнень.

2. Доведено, що резистентні до НПХТ за схемою 4АС новоутворення за системою оцінки RECIST 1.1. мають підвищену експресію стромального COL1A1 ( $1,608 \pm 0,02659$  у.о.), COL12A1 ( $1,364 \pm 0,01556$  у.о.) та знижену експресію COL3A1 ( $1,297 \pm 0,01669$  у.о.), в той час як в тканинах, чутливих до НПХТ за схемою 4АС, фіксують достовірно менші рівні експресії COL1A1 ( $1,487 \pm 0,03124$  у.о.) та COL12A1 ( $1,267 \pm 0,01010$  у.о.), а також високі показники експресії COL3A1 ( $1,355 \pm 0,02243$  у.о.).

3. При оцінці терапевтичного ефекту за Лавніковою встановлено достовірно вищі рівні експресії COL1A1 ( $1,586 \pm 0,02137$  у.о.) та COL12A1 ( $1,356 \pm 0,01479$  у.о.) в резистентних новоутвореннях порівняно з чутливими до НПХТ за схемою 4АС ( $1,405 \pm 0,02926$  у.о. та  $1,268 \pm 0,009965$  у.о. відповідно).

4. Тканина новоутворень молочної залози хворих молодого віку із діагностованим впродовж 3 років рецидивом має достовірно нижчі значення оптичної щільності COL12A1 ( $1,261 \pm 0,01786$  у.о.,  $p < 0,0087$ ) та вищі показники щільності COL1A1 ( $1,595 \pm 0,03841$  у.о.,  $p < 0,025$ ) і COL3A1 ( $1,386 \pm 0,02824$ ;  $p < 0,0008$ ).

5. Застосування колагенів як предиктивних маркерів ефективності НХПТ хворих на РМЗ молодого віку підвищує безпосередні результати лікування (зростання рівня регресії новоутворень за шкалою ВООЗ на 17% та клінічної регресії на 10%) і призводить до покращення якості життя пацієнток цієї групи на 13%.

## ПЕРЕЛІК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Chekhun V, Martynyuk O, Lukianova Y, et al. Features of breast cancer in patients of young age: search for diagnosis optimization and personalized treatment. *Exp Oncol*. 2023;45(2):139-150. doi:10.15407/exp-oncology.2023.02.139.
2. Lee HB, Han W. Unique features of young age breast cancer and its management. *J Breast Cancer*. 2014;17(4):301-307. doi:10.4048/jbc.2014.17.4.301
3. Natal RA, Paiva GR, Pelegati VB, et al. Exploring collagen parameters in pure special types of invasive breast cancer. *Sci Rep*. 2019;9(1):7715. doi:10.1038/s41598-019-44156-9.
4. An J, Peng C, Tang H, et al. New advances in the research of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(17):9644. doi:10.3390/ijms22179644.
5. Li F, Yang Y, Wei Y, et al. Predicting neoadjuvant chemotherapy benefit using deep learning from stromal histology in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2022;8(1):124. doi:10.1038/s41523-022-00491-1.
6. Kashiwagi S, Asano Y, Takada K, et al. Outcome prediction after neoadjuvant chemotherapy (NAC) for breast cancer, using tumor-infiltrating lymphocytes within fibrotic foci of tumor stroma (FF-TILs). *Anticancer Res*. 2022;42(3):1421-1431. doi:10.21873/anticancer.15612.
7. Wang Y, Brodsky AS, Xiong J, et al. Stromal clusterin expression predicts therapeutic response to neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2018;18(3):e373-e379. doi:10.1016/j.clbc.2017.08.007.
8. Seyed JSM, Hunger RE. IHC optical density score: a new practical method for quantitative immunohistochemistry image analysis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25(1):e12-e13. doi: 10.1097/PAI.0000000000000370.
9. Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., et al. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. *Exp Oncol*. 2023; 45(3):351-363. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.03.351>