

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

ГАРАЩЕНКО ОКСАНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 618.19-006-07:085

ДИСЕРТАЦІЯ
**ОПТИМІЗАЦІЯ ДІАГНОСТИЧНО-ЛІКУВАЛЬНОГО АЛГОРИТМУ У
ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

222 - Медицина

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ Гаращенко О.О.

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор
Коноваленко Володимир Федорович

Київ – 2024

АНОТАЦІЯ

Гаращенко О.О. Оптимізація діагностично-лікувального алгоритму у хворих на рак молочної залози. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» зі спеціальності 222 «Медицина» (онкологія) – Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2024.

Рак молочної залози (РМЗ) є найпоширенішим різновидом раку за кількістю нових випадків - понад 2,2 млн випадків, тому це захворювання являє собою актуальну медико-соціальну проблему, яка потребує нових рішень. За різними клінічними дослідженнями показник смертності складає від 6% до 20% усіх смертей серед категорії онкохворих жінок; у 2020 році у всьому світі було діагностовано 2,3 мільйона жінок з РМЗ і 685 000 летальних випадків.

Клінічні та експериментальні дослідження з метою підвищення ефективності лікування цієї форми раку продовжуються у науково-дослідних та лікувальних установах по всьому світу. Більшість досліджень присвячені вдосконаленню підходів до лікування хворих на РМЗ з метою підвищення показників загальної та безрецидивної виживаності, а також для забезпечення задовільної якості життя пацієнток.

На сучасному етапі методи діагностики та лікування онкологічної патології зазнають інтенсивного розвитку. Логічним продовженням еволюційного прогресу у покращенні результатів терапії в 21 столітті стало поступове впровадження в клінічну практику принципів персоналізованої медицини. У сучасних роботах дослідників прослідковується очевидна тенденція до підготовки вагомого підґрунтя для скорочення термінів від отримання перших результатів застосування новітніх методів діагностики та лікування в рамках клінічних досліджень до імплементації їх у повсякденну лікарську практику.

В роботі наголошується, що клініцисти навіть за умов врахування біологічних особливостей пухлини, застосування стандартних комплексних методів лікування в онкології, які включають хірургічне втручання, курси хіміотерапії, променеву терапію, антигормональну, таргетну та імунотерапію у багатьох випадках не досягають бажаної мети, про що свідчать дані з публікацій 2024 року [156-159]. Тому на сучасному етапі кристалізується актуальність інноваційних стратегій застосування більш персоналізованого підходу до лікувальної тактики у хворих на РМЗ з використанням комплексу терапевтичних впливів у конкретної пацієнтки, після вивчення чутливості пухлини до засобів хіміотерапії, застосування таргетної терапії, того чи іншого профілю міРНК.

Застосування новітніх методів онкореконструктивних оперативних втручань дає можливість зберегти молочні залози та відійти від мастектомій. Видалення сигнальних лімфовузлів замість агресивних лімфаденектомій є профілактикою лімфостазу верхньої кінцівки.

Проведення променевої терапії згідно з післяопераційною розміткою і на сучасному обладнанні, дає можливість зменшити, навіть уникнути постпроменевих пульмоно та кардіофіброзів, лімфостазів.

Дотепер міРНК при раку молочної залози класифікувалися на основі їх моделей експресії, функціональних ролей і клінічних наслідків. Натомість у виконаному дисертаційному дослідженні вперше ідентифіковано біомаркери міРНК та їхні асоціації з конкретними підтипами раку, з віком пацієнток та стадією хвороби, а також на основі отриманих даних реалізовано персоналізовані підходи до лікування.

Застосування оптимізованого діагностично-лікувального алгоритму у хворих, яким лікування проводилося з урахуванням чутливості пухлини до ПХТ в неоад'ювантному режимі порівняно з хворими, яким проводилася ПХТ за стандартними протоколами, призвело до достовірного підвищення показників ефективності лікування хворих на РМЗ. Показники загальної 3-річної виживаності в досліджуваній та контрольній групах становили

92,06 $\pm$ 3,8% та 82,3 $\pm$ 5,0% відповідно, тоді як 5-річної – 88,2 $\pm$ 5,0% та 80,4 $\pm$ 10,5% відповідно. Різниця зазначених показників статистично достовірна ($p = 0,04$). Показники безрецидивної 3-річної виживаності в досліджуваній та контрольній групах становили 72,4 $\pm$ 6,7% та 76,5 $\pm$ 8,4% відповідно, а 5-річної - 58,6 $\pm$ 9,0% та 31,7 $\pm$ 9,5% відповідно. Різниця статистично достовірна лише для показників 5-річної безрецидивної виживаності (26,9%, $p = 0,03$).

Аналіз рівня циркулюючих міРНК у пацієнток свідчить про тенденції до їх кореляції з клінічним перебігом захворювання, що може бути обгрунтованою відправною точкою для розробки індивідуальної стратегії терапії. При оцінці рівнів експресії міРНК встановлено, що вікові характеристики пацієнток мали значення щодо зміни експресії міРНК-27 та міРНК-497 в рівній мірі як для групи, які одержували НПХТ, так і після АПХТ. При цьому експресія цих 2-х міРНК мала протилежну залежність, у міРНК-27 вона була достовірно меншою у пременопаузальних жінок і зростала з віком, а експресія міРНК-497 була достовірно більшою у хворих незалежно від віку.

В ході клінічного моніторингу пацієнток вперше встановлено, що порівняно із здоровими жінками у хворих на РМЗ експресія міРНК має певні відмонності. А саме, відзначається тенденція до зростання експресії міРНК-497 при IIIA-IV стадії і міРНК-200 при IV стадії, а також зменшення міРНК-27 при IIB-IV стадії. Проведене дослідження відкриває перспективи використання даних аналізу експресії зазначених міРНК з метою оцінки ефективності лікування та прогнозу клінічного перебігу захворювання у хворих на РМЗ.

У дисертаційному дослідженні приділено увагу персоналізованому лікуванню хворих на РМЗ, яке ґрунтується на оцінці надійних прогностичних біомаркерів, здатних прогнозувати результати. Отримані в ході дослідження дані доповнюють базу актуальної наукової інформації щодо ролі міРНК в клінічному перебігу РМЗ та відкривають можливості для

збагачення діагностичного арсеналу лікаря онколога, а також надають додаткові інструменти для прогностичної оцінки ефективності лікування, що невідворотно впливатиме на показники виживаності та якість життя пацієнток.

У дисертаційній роботі вперше представлено наукове обґрунтування та нове вирішення актуальної для сучасної онкології задачі – підвищення ефективності лікування хворих на РМЗ шляхом розробки діагностично-лікувального алгоритму, який включає вивчення можливостей персоналізації діагностики, лікування та моніторингу клінічного перебігу захворювання із застосуванням схем ПХТ після визначення індивідуальної чутливості пухлинних клітин до цитостатичної дії та створення діагностичної панелі міРНК.

Результати дослідження вперше доводять, що комплексна оцінка біологічних маркерів онкологічного процесу відіграє вирішальну роль у розширенні можливостей зменшення в обсязі первинної пухлини молочної залози і регіонарних лімфовузлів та збільшує можливість застосування органозберігаючих хірургічних втручань.

Ключові слова: рак молочної залози, біомаркери, міРНК, персоніфіковане лікування, клінічний моніторинг, трирічна виживаність, п'ятирічна виживаність, лікувальний патоморфоз, імуногістохімія, неoad'ювантна поліхіміотерапія, ад'ювантна поліхіміотерапія, променева терапія, радіологічні дослідження, прогноз лікування, оптимізація.

SUMMARY

Oksana. O. Harashchenko Optimization of the diagnostic and treatment algorithm in breast cancer patients. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 "Health care" from the specialty 222 "Medicine" (oncology) - Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology named after RE. Kavetsky National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

Breast cancer (BC) is the most common type of cancer in terms of the number of new cases - more than 2.2 million cases, so this disease is an urgent medical and social problem that needs new solutions. According to various clinical studies, the mortality rate ranges from 6% to 20% of all deaths among women with cancer; in 2020, 2.3 million women were diagnosed with breast cancer and 685,000 deaths worldwide.

Clinical and experimental studies aimed at increasing the effectiveness of treatment of this form of cancer continue in research and medical institutions around the world. Most of the studies are dedicated to improving approaches to the treatment of patients with breast cancer in order to increase the overall and recurrence-free survival rates, as well as to ensure a satisfactory quality of life for patients.

At the current stage, methods of diagnosis and treatment of oncological pathology are undergoing intensive development. The logical continuation of the evolutionary progress in improving the results of therapy in the 21st century was the gradual introduction into clinical practice of the principles of personalized medicine. In the modern works of researchers, there is an obvious tendency to prepare a solid basis for shortening the time from obtaining the first results of the application of the latest methods of diagnosis and treatment within the framework of clinical studies to their implementation in everyday medical practice.

The work emphasizes that the clinician, even taking into account the biological features of the tumor, the use of standard complex methods of treatment

in oncology, which include surgical intervention, chemotherapy courses, radiation therapy, anti-hormonal, targeted and immunotherapy, in many cases do not achieve the desired goal, as evidenced by the data from publications of 2024 [156-159]. Therefore, at the current stage, the relevance of innovative strategies for applying a more personalized approach to treatment tactics in patients with breast cancer using a complex of therapeutic effects in a specific patient, after studying the sensitivity of the tumor to chemotherapy agents, the use of targeted therapy, this or that microRNA profile, is crystallized.

The use of the latest methods of oncoreconstructive surgical interventions makes it possible to preserve the mammary glands and to avoid mastectomies. Removal of signal lymph nodes instead of aggressive lymphadenectomies is a prevention of lymphostasis of the upper limb.

Conducting radiation therapy in accordance with postoperative markings and on modern equipment makes it possible to reduce, even avoid post-radiation pulmonary and cardiofibrosis, lymphostasis.

Until now, miRNAs in breast cancer have been classified based on their expression patterns, functional roles, and clinical implications. Instead, the completed dissertation research identified for the first time miRNA biomarkers and their associations with specific cancer subtypes, with patient age and stage of the disease, and based on the obtained data, personalized approaches to treatment were implemented.

The use of an optimized diagnostic and treatment algorithm in patients who were treated taking into account the sensitivity of the tumor to PCT in the neoadjuvant regimen compared to patients who underwent PCT according to standard protocols, led to a significant increase in the treatment effectiveness of patients with breast cancer. The overall 3-year survival rates in the study and control groups were $92.06 \pm 3.8\%$ and $82.3 \pm 5.0\%$, respectively, while the 5-year survival rates were $88.2 \pm 5.0\%$ and $80.4 \pm 10.5\%$ respectively. The difference of these indicators is statistically significant ($p = 0.04$). The 3-year recurrence-free survival rates in the study and control groups were $72.4 \pm 6.7\%$ and $76.5 \pm 8.4\%$,

respectively, and the 5-year survival rates were 58.6+9.0% and 31.7+9.5% respectively. The difference is statistically significant only for indicators of 5-year recurrence-free survival (26.9%, $p = 0.03$).

Thanks to the analysis of the level of plasma miRNAs of the patients, trends in their correlation with the clinical course of the disease were determined, which can be a reasonable starting point for the development of an individual therapy strategy. When evaluating the levels of miRNA expression, it was found that the age characteristics of the patients were significant in terms of changes in the expression of miRNA-27 and miRNA-497 equally for the group that received APHT and after NPHT. At the same time, the expression of these 2 miRNAs had the opposite dependence, in miRNA-27 it was significantly lower in premenopausal women and increased with age, and the expression of miRNA-497 was significantly higher in patients regardless of age.

In the course of clinical monitoring of female patients, it was established for the first time that, compared to healthy women, the expression of miRNA in breast cancer patients has certain differences. Namely, there is a trend towards an increase in the expression of miRNA-497 at IIIA-IV stage and miRNA-200 at IV stage, as well as a decrease of miRNA-27 at IIV-IV stage. The conducted study opens up the prospects of using data from the analysis of the expression of the specified miRNAs for the purpose of evaluating the effectiveness of treatment and forecasting the clinical course of the disease in patients with breast cancer.

The dissertation study focuses on personalized treatment of patients with breast cancer, which is based on the assessment of reliable prognostic biomarkers capable of predicting outcomes. The data obtained during the study complement the base of current scientific information on the role of miRNA in the clinical course of breast cancer and open up opportunities to enrich the diagnostic arsenal of the oncologist, as well as provide additional tools for prognostic assessment of the effectiveness of treatment, which will inevitably affect the survival rates and quality of life of patients.

The dissertation presents for the first time a scientific justification and a new solution to a problem that is relevant for modern oncology - increasing the effectiveness of the treatment of patients with breast cancer by developing a diagnostic and treatment algorithm, which includes studying the possibilities of personalizing diagnosis, treatment and monitoring the clinical course of the disease using PCT schemes after determining individual sensitivity of tumor cells to cytostatic action and creation of a diagnostic miRNA panel.

The results of the study prove for the first time that the comprehensive evaluation of biological markers of the oncological process plays a decisive role in expanding the possibilities of reducing the volume of the primary breast tumor and regional lymph nodes and increases the possibility of using organ-preserving surgical interventions.

Key words: breast cancer, miRNA, biomarkers, personalized treatment, clinical monitoring, three-year survival, five-year survival, therapeutic pathomorphosis, immunohistochemistry, neoadjuvant polychemotherapy, adjuvant polychemotherapy, radiation therapy, radiological studies, treatment prognosis, optimization.

Список публікацій здобувачки

1. Гаращенко О.О. Рівень плазмових міРНК у хворих на рак молочної залози та їх кореляція з клінічною картиною пацієнтів як показник для індивідуалізованого лікування. Клінічна онкологія. 2024; 14(1): 1-7. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.53-1.31750
2. O. Harashchenko. Assessment of circulating miRNA levels in breast cancer patients depending on clinical characteristics and chemotherapy. Exp Oncol. 2023; 45(4): 451-456. DOI: 10.15407/exp-oncology.2023.04.451
3. Harashchenko O, Antonov V., Konovalenko V. Support tool for decision-making in selecting chemotherapy tactics for treatment of breast cancer patients. Georgian Med News. 2019; 6(291): 20-25.
4. В.Ф. Коноваленко, О.О. Гаращенко, С.В. Коноваленко. Сучасні підходи до діагностики і лікування хворих на рак молочної залози. Онкологія. 2021; 23(1): 1-9.
5. Konovalenko, V., Drobotun, O., Ternovyy, N. Konovalenko, S., Garashchenko, O. Monitoring and personalization in treatment of breast cancer patients with metastatic bone lesions. Eureka: Health Sciences: 2022; 1: 37-48.
6. Harashchenko O.O, Konovalenko V.F. Analysis of plasma MirNA-497 levels in the blood of patients with breast cancer. Georgian Med News. 2023; 7(340): 212-216.
7. О. О. Гаращенко, В. К. Антонов, В. Ф. Коноваленко. Система підтримки прийняття рішень при виборі тактики хіміотерапії хворих на рак грудної залози. Тези доповіді на конференції «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоніфікованої терапії раку» (3–4 жовтня 2019 р., Київ): 78-79.

ЗМІСТ**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 14****ВСТУП 16****РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 23**

- 1.1 Актуальність та сучасний стан вивчення проблеми лікування РМЗ з урахуванням молекулярно-біологічних особливостей пухлин 23
- 1.2 Стратегія лікування РМЗ на сучасному етапі 26
- 1.3 Особливості клінічного перебігу РМЗ, прогресія та метастазування 36
- 1.4 Роль міРНК у персоніфікованій діагностиці, клінічному моніторингу і прогнозі перебігу РМЗ 44
- 1.5 Перспективи удосконалення персоніфікованого лікування хворих на РМЗ 51

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ 61

- 2.1 Загальна характеристика хворих на РМЗ 61
- 2.2 Методи обстеження хворих на злоякісні пухлини молочної залози 62
- 2.3 Методи морфологічного і морфометричного дослідження пухлин молочної залози 64
- 2.4 Імуногістохімічний метод дослідження пухлин молочної залози 65
- 2.5 Дослідження експресії панелі міРНК у сироватці крові та пухлинній тканині 66
- 2.6 Методи визначення чутливості клітин РМЗ до протипухлинних препаратів 66
- 2.7 Методи лікування хворих на злоякісні пухлини молочної залози 67
- 2.7.1 Хіміотерапія 67

2.7.2	Методики хірургічного лікування хворих на РМЗ	68
2.7.3	Методики променевої терапії хворих на рак молочної залози	69
2.8	Вивчення вмісту маркерів обміну кісткової тканини	70
2.9	Методи статистичної обробки отриманих результатів дослідження	71

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РМЗ

3.1	Безпосередні та найближчі результати лікування	72
3.1.1	Порівняльна характеристика результатів хірургічних втручань у досліджуваній та контрольній групах	72
3.1.2	Порівняльна характеристика результатів променевої терапії у пацієнтів досліджуваної та контрольної груп	72
3.1.3	Результати вивчення цитотоксичної ефективності протипухлинних лікарських засобів у хворих досліджуваної та контрольної груп	73
3.1.4	Порівняльна характеристика ускладнень після поліхіміотерапії у хворих досліджуваної та контрольної груп	74
3.2	Віддалені результати лікування	76
3.3	Результати моніторингу клінічного перебігу РМЗ у хворих на метастатичні ураження кісток	79

РОЗДІЛ 4. ПРОФІЛЬ ЕКСПРЕСІЇ міРНК У ЗДОРОВИХ ЖІНОК ТА ХВОРИХ НА РМЗ

4.1	Дослідження профілю експресії міРНК у здорових жінок	84
4.2	Дослідження рівня експресії міРНК у плазмі крові хворих на РМЗ з урахуванням віку та тактики лікування	90
4.3	Рівень експресії міРНК залежно від стадії РМЗ	93
4.4	Кореляція між рівнем експресії міРНК у здорових жінок та хворих на РМЗ	95
4.5	Рівень експресії міРНК у хворих на РМЗ з урахуванням	97

	молекулярного типу пухлини	
4.6	Оцінка рівня експресії міРНК у хворих на РМЗ після курсу НПХТ	102
4.7	Кореляція між експресією міРНК та основними імуногістохімічними характеристиками пухлин різних молекулярних типів	103
	РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	110
	ВИСНОВКИ	117
	ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	119
	ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	120
	Додаток А	154

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ІЦХ – імуноцитохімія

МкАТ – моноклональні антитіла

РМЗ – рак молочної залози

ХТ – хіміотерапія

МЗ – молочна залоза

РМЗ – рак молочної залози

САК – сосково ареолярний комплекс

ІГХ – імуногістохімія

ПГЗ – патогістологічне заключення

НПХТ – неoad'ювантна поліхіміотерапія

АПХТ – ад'ювантна поліхіміотерапія

ЗАК – загальний аналіз крові

Б/Х - біохімічний аналіз крові

ЕхоКГ - ехокардіографія

ЕКГ – електрокардіографія

КТ – комп'ютерна томографія

ММГ – мамографія

УЗД – ультразвукова діагностика

МРТ - магнітно-резонансна томографія

ПЕТ - позитронно-емісійної томографії

МДКТ- мультидетекторної комп'ютерної томографії

ЕГДС - езофагогастродуоденоскопії

РМЕ – радикальна мастектомія

Л/В - лімфовузли

Кл. гр. - клінічна група

ПХТ – поліхіміотерапія

ТТ – таргетна терапія

ПТ – променева терапія

ГТ – гормональна терапія

ГА - гормональна абляція

ІТ – імунотерапія

ІПМЗ - іпсилатеральної пухлини молочної залози

ER- естроген

PR – прогестерон

ОГП – органи грудної порожнини

ОЧП – органи черевної порожнини

ОМТ – органи малого тазу

ПР - повний регрес

ЧР - частковий регрес

СЗ - стабілізація захворювання

ПЗ - прогресування захворювання

ЗТ-ПЛР - зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції

СТХ - С-кінцевий телопептид

ТРКФ-5 - тартратрезистентна кисла фосфатаза

ДПД - дезоксипіридинолін

КЛФ- кісткова лужна фосфатаза

СК - стегнової кістки

ШОК - швидкість об'ємного кровотоку

ШОКК - швидкість об'ємного капілярного кровотоку

ОК - об'єм крові

ЧТ - час транзиту

ВСТУП

Актуальність теми. Статистичні дані, представлені у звіті Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) свідчать, що рак є другою причиною смерті в усьому світі.

У 2022 році внаслідок смертності від онкологічних захворювань загинуло 10 мільйонів людей [1,2].

Рак молочної залози (РМЗ) є найпоширенішим різновидом раку за кількістю нових випадків - понад 2,2 млн випадків, тому це захворювання являє собою актуальну медико-соціальну проблему, яка потребує нових рішень. Клінічні та експериментальні дослідження з метою підвищення ефективності лікування цієї форми раку продовжуються у науково-дослідних та лікувальних установах по всьому світу [2,3]. Більшість досліджень присвячені вдосконаленню підходів до лікування хворих на РМЗ з метою підвищення показників загальної та безрецидивної виживаності, а також для забезпечення задовільної якості життя пацієнток.

Через варіації молекулярних характеристик, гістологічних особливостей і клінічних результатів РМЗ класифікується на кілька підтипів, що дає цінну інформацію про захворювання та допомагає в плануванні лікування. РМЗ зазвичай поділяють на чотири субтипи на основі їх молекулярних характеристик: люмінальний А і В, HER2-позитивний і тричінегативний. Тричінегативний рак молочної залози не має експресії рецептора естрогену (ER), рецептора прогестерону (PR) і HER2 та пов'язаний з вищим ризиком рецидиву захворювання та більшою ймовірністю розвитку вісцеральних метастазів [4].

Біомаркери відіграють вирішальну роль у визначенні та прогнозуванні результатів, а також у терапевтичних підходах до лікування РМЗ. Однак, деякі широко використовувані біомаркери, включаючи карциноембріональний антиген (CEA), СА 15-3 і СА 27-29, мають

недостатню чутливість і специфічність, що робить їх малопридатними у рутинній медичній практиці для виявлення захворювання.

На шляху пошуку способів вдосконалення діагностичних і лікувальних методик для дослідників вкрай важливо отримати повне розуміння молекулярних механізмів, які лежать в основі канцерогенезу молочної залози. Незважаючи на багаторічні цілеспрямовані дослідження клінічного перебігу захворювання у хворих на РМЗ і впровадження у повсякденну клінічну практику препаратів таргентної біотерапії, показники загальної 5-річної виживаності залишаються незадовільними [4,5].

Тому, у епоху інтенсивного розвитку трансляційної, інтегративної і персоніфікованої медицини виникають передумови для розробки методів індивідуалізації діагностики і лікування хворих на РМЗ; тобто таких клінічних заходів, які спрямовані не на захворювання взагалі, а задовольняють потреби конкретного випадку у конкретної пацієнтки [5].

У відповідь на виклики сучасної онкології, дисертаційна робота розкриває нові можливості підвищення ефективності лікування хворих на РМЗ шляхом розробки оптимізованого діагностично-лікувального алгоритму, а також поліпшення якості життя пацієнток завдяки постійному клінічному моніторингу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертація виконувалась в рамках науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім.Р.Є.Кавецького НАН України: «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (2017-2021 рр., № держреєстрації 0117U002034), «Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень» (2019-2023 рр., № держреєстрації 0118U005468) та «Персоніфікована діагностика та лікування хворих з пухлинними ураженнями кісток» (2020 – 2022 рр. № держреєстрації 0119U103906).

Мета дослідження.

З'ясувати можливості підвищення ефективності лікування хворих на РМЗ шляхом інтеграції до існуючої діагностично-лікувальної стратегії персоніфікованих підходів з використанням панелі міРНК, оцінки чутливості пухлинних клітин до хіміотерапії, врахування лікувального патоморфозу та моніторингу маркерів кісткової резорбції.

Задачі дослідження.

1. Вивчити та оцінити безпосередні та віддалені результати лікування хворих на РМЗ після проведення променевої терапії, а також НПХТ та АПХТ з урахуванням чутливості пухлинних клітин до дії хіміопрепаратів.
2. Оцінити клінічний перебіг РМЗ у хворих на метастатичні ураження кісток.
3. Вивчити динаміку вмісту маркерів кісткової резорбції та остеогенезу під час моніторингу клінічного перебігу захворювання у хворих на РМЗ.
4. Проаналізувати рівень експресії панелі міРНК з урахуванням вікових характеристик хворих на РМЗ, стадії пухлинного процесу, основних імуногістохімічних характеристик пухлин.
5. З'ясувати можливість оцінки чутливості до хіміотерапії з урахуванням рівня експресії міРНК в сироватці крові хворих на РМЗ як етапу інноваційного діагностично-лікувального алгоритму.
6. Оптимізувати діагностично-лікувальний алгоритм для хворих на РМЗ з метою впровадження у клінічну практику.

Об'єкт дослідження: рак молочної залози.

Предмет дослідження: молекулярно-біологічні особливості РМЗ з урахуванням клінічної характеристики хворих, безпосередні та віддалені результати лікування хворих на РМЗ, діагностичний та лікувальний алгоритм хворих на РМЗ.

Методи дослідження: загальноклінічні (анамнез, спадковість, об'єктивне обстеження), інструментальні (аспіраційна тонкогolgкова біопсія), лабораторні (загальний аналіз крові, загальний аналіз сечі, аналіз експресії міРНК), патоморфологічні, імуногістохімічні, радіологічні, статистичні

(пакет прикладних програм STATISTICA 6.0 for Windows, Stat Soft, Inc., USA; параметричні та непараметричні критерії, зокрема метод t-критерій Ст'юдента або U-критерій Манна-Уїтні; достовірність міжгрупових відмінностей проводили за допомогою критерію χ^2 та Краскела-Уолліса).

Наукова новизна одержаних результатів.

У дисертаційній роботі вперше представлено наукове обґрунтування та нове практичне вирішення актуальної для сучасної онкології задачі – підвищення ефективності лікування хворих на РМЗ з урахуванням Це завдання вирішене шляхом розробки інноваційного діагностично-лікувального алгоритму, який на відміну від загально прийнятого маршруту пацієнтки за схемою «діагностика – лікування – оцінка ефективності – моніторинг», включає:

- 1) діагностику з урахуванням молекулярно-біологічних підтипів пухлини та її стадійності, а також оцінку чутливості пухлинних клітин до хіміопрепаратів перед проведенням курсів ХТ;
- 2) органозберігаюче хірургічне втручання з обов'язковим вивченням лікувального патоморфозу пухлини;
- 3) на основі оцінки лікувального патоморфозу – прийняття рішення щодо продовження хіміотерапевтичного протоколу в АПХТ-режимі або його корекції
- 4) в процесі моніторингу 1 раз на 3 місяці визначення вмісту маркерів кісткової резорбції та остеогенезу в біологічних рідинах пацієнтки.

Запропонована стратегія реалізує комплексний діагностично-лікувальний підхід і призводить до підвищення показників 3-річної та 5-річної загальної та безрецидивної виживаності, підвищення якості життя пацієнток та своєчасного виявлення можливого поширення пухлинного процесу на кісткову систему. Зокрема, встановлено, що показники загальної 3-річної виживаності в досліджуваній та контрольній групах становлять $92,06 \pm 3,8\%$ та $82,3 \pm 5,0\%$ відповідно; 5-річної виживаності – $88,2 \pm 5,0\%$ та $80,4 \pm 10,5\%$ відповідно. Показники безрецидивної 3-річної виживаності в

досліджуваних та контрольній групах становлять $72,4 \pm 6,7\%$ та $76,5 \pm 8,4\%$ відповідно, а 5-річної безрецидивної виживаності - $58,6 \pm 9,0\%$ та $31,7 \pm 9,5\%$ відповідно. Різниця статистично достовірна лише для показників 5-річної безрецидивної виживаності ($26,9\%$, $p = 0,03$).

Доповнено наукові дані, щодо експресії циркулюючих міРНК у здорових жінок та хворих на РМЗ із урахуванням фактора віку: у віковій категорії 45 років і старше відмічено достовірно вищий рівень експресії міРНК-663 і -205 у хворих на РМЗ, аніж у здорових жінок, тоді як рівень експресії міРНК-335 та -497 був достовірно вищим, а міРНК-27 – меншим у хворих жінок до 45 років порівняно із здоровими жінками. Окрім цього, у хворих на РМЗ різних молекулярних типів виявлено достовірні кореляційні зв'язки між експресією міРНК та основними імуногістохімічними характеристиками пухлин лише при люмінальному А РМЗ: міРНК-30 vs RP ($r=0,64$, $p=0,03$), міРНК-200 vs Ki-67 ($r= -0,78$, $p=0,0001$), міРНК-205 vs Ki-67 ($r=0,69$, $p=0,02$).

В ході проведення дослідження вперше встановлено, що існують множинні позитивні кореляції між експресією міРНК-25 у хворих з ІІА стадією та експресією міРНК-155, -497, -139, -27, -30, -335; визначено наявність позитивних кореляцій між рівнем експресії міРНК-27 та міРНК-30, -139, -25, -205 у пацієток з І, ІІ та ІІІ стадіями. Вперше показано, що експресія міРНК-663 достовірно зростає у пацієток з ІІА стадією в постменопаузі та корелює з експресією міРНК-155.

Вперше виявлені особливості експресії міРНК-25, -27, -497 з урахуванням застосованих схем лікування та вікових характеристик хворих: у хворих віком 45 років і старше при АПХТ констатовано вищі показники міРНК-27, -497, тоді як при НПХТ - менші значення міРНК-497, аніж у жінок віком до 45 років. Встановлено достовірне зменшення рівня експресії міРНК-25 в ході проведення НПХТ.

Практичне значення одержаних результатів.

Встановлено, що визначення рівня експресії міРНК-25, -27, -497 в плазмі крові хворих на РМЗ може бути використано для оцінки показників ефективності лікування. Дослідження рівня експресії міРНК-25 є найбільш перспективним, оскільки встановлено тенденцію до його зростання у хворих, особливо при стадії ІІА. Отримані дані підтверджують доцільність визначення чутливості пухлини до ПХТ перед початком терапії. Практичне значення розробленого в ході дисертаційної роботи персоніфікованого діагностично-лікувального алгоритму полягає в тому, що його впровадження забезпечить підвищення ефективності комплексного лікування хворих на РМЗ та значно підвищить якість життя пацієнток після повного курсу спеціалізованого лікування.

В результаті проведення моніторингу клінічного перебігу РМЗ у хворих на метастатичні ураження кісток встановлено, що в рамках спостереження пацієнток необхідно обов'язково досліджувати маркери кісткової резорбції і остеогенезу, так як підвищення їх вмісту у крові і сечі дозволяє запідозрити метастатичне ураження кісток на 3-6 місяців раніше клінічної і радіологічної маніфестації пухлинного процесу з метастазуванням в кістки.

Після виявлення у хворих ознак метастатичного ураження кісток необхідно вчасно призначити курси бісфосфонатів, моноклональних антитіл та променевої терапії.

При загрозі патологічного перелому кістки або за його наявності потрібне своєчасне проведення паліативного хірургічного втручання в обсязі видалення патологічного вогнища в кістці з заміщенням дефекту ендопротезом, що призводить до значного поліпшення якості життя хворих.

Особистий внесок здобувачки.

Всі дослідження виконувались за безпосередньої участі здобувачки. Більшість даних, а також обробка і аналіз отриманих результатів виконано і представлено особисто здобувачкою. Мета та дизайн дослідження розроблені у співпраці з науковим керівником. Здобувачкою особисто проведено

інформаційний пошук та аналіз наукової літератури з питань, які були об'єктом і предметом дослідження. Здобувачка самостійно провела аналіз одержаних результатів та здійснив їх статистичну обробку. Дисертантка брала безпосередню участь у підготовці наукових публікацій до друку. Спільно з науковим керівником сформульовано основні положення та висновки дисертації. У роботах, написаних у співавторстві реалізовані наукові ідеї здобувачки.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи були представлені та обговорені на: XIV з'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2021), та Conference "International scientific integration '2023" (Сієтл, США).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 7 наукових праць, зокрема 6 статей, серед яких 3 статті у журналах, що належать до фахових видань із переліку затверджених МОН України (2 з яких у виданнях, що індексуються у наукометричній базі даних Scopus) та 1 тези у збірці наукової конференції.

Обсяг та структура дисертації. Дисертацію викладено українською мовою на 155 сторінках комп'ютерного набору. Робота містить наступні розділи: вступ, огляд літератури, матеріали та методи дослідження, результати власних досліджень, узагальнення та обговорення отриманих результатів, висновки та список використаної літератури, який налічує 284 посилань. Робота проілюстрована 11 рисунками та 23 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Актуальність та сучасний стан вивчення проблеми лікування РМЗ з урахуванням молекулярно-біологічних особливостей пухлин

Рак молочної залози (РМЗ) – найпоширеніша онкологічна патологія серед жінок у багатьох країнах світу. Захворюваність невідпинно зростає і прогнозована динаміка є невтішною, зокрема через те, що РМЗ все частіше діагностується у молодих жінок [1,2]. За різними клінічними дослідженнями показник смертності складає від 6% до 20% усіх смертей серед категорії онкохворих жінок.

У 2020 році за статистичними даними ВООЗ у всьому світі було зареєстровано 2,3 мільйона жінок хворих на РМЗ і 685 000 летальних випадків внаслідок цієї патології [3,4]. Майже третина хворих є жінками репродуктивного віку, а інші у менопаузі. Пік захворюваності від 30 до 74 років[5].

В Україні РМЗ посідає перше місце серед онкологічних захворювань у жінок. Рівень захворюваності на РМЗ зріс вдвічі за останні 30 років, з річним приростом на рівні 7,1% (понад 16 тисяч нових випадків щороку) [6,7]. Захворюваність на РМЗ позначається на соціально-демографічній ситуації країни і тому потребує особливої уваги щодо вивчення захворювання, удосконалення алгоритму діагностики та підвищення показників ефективності лікування.

Незважаючи на невтішну статистику захворюваності, на яку часто впливає особливість діагностики РМЗ в нашій країні - це несвоєчасне звернення та пізнє діагностування патології в поширених стадіях, загальна якість діагностики та раннє виявлення РМЗ, ефективність лікування та прогноз захворювання за останні десятиліття значно покращилися. Так очікувана 5-річна виживаність зросла з 40% до майже 75% за останні 50 років [8,12,13]. Незадовільні результати лікування як правило є наслідком того, що

багато жінок звертаються за спеціалізованою медичною допомогою, коли РМЗ вже досяг пізньої стадії розвитку (III-IV стадія) [8,14,15]. Це значно ускладнює лікування і погіршує прогноз, тому близько третини жінок помирають протягом першого року після встановлення діагнозу [9,10].

Існують декілька факторів ризику розвитку РМЗ, які можна поділити на модифіковані і немодифіковані. Модифіковані фактори включають використання оральних контрацептивів та замісної гормональної терапії під час менопаузи. Пізня перша вагітність або її відсутність, відсутність лактації. Травми молочних залоз. Надмірну вагу або ожиріння, низьку фізичну активність, роботу в змінному графіку (особливо вночі), куріння (особливо перед першою вагітністю), вживання алкоголю і висококалорійну дієту. Немодифіковані фактори включають сімейну історію раку молочної залози - успадковані мутації генів, такі як BRCA1/BRCA2, CHEK2, PALB2 та більше 15 інших асоційованих з РМЗ генів. E-кадгерин 1, PTEN. Високу щільність тканин молочної залози. Деякі доброякісні захворювання молочної залози. Підвищений рівень статевих гормонів або схильність до дисгормональних розладів. [9,10,11,17,18].

Злоякісні пухлини молочної залози як і доброякісні пухлини зазвичай починають свій розвиток внаслідок гіперпроліферації в протоках, або дольках яка потім постійно стимулюється різними гормональними та канцерогенними факторами. Коли процес проходить далі за базальну мембрану - інвазивний ріст - така пухлина класифікується як злоякісна. [19,20,21]. Рак молочної залози починається і прогресує по-різному залежно від мікрооточення пухлини, наприклад, впливу строми або макрофагів. Мутагенне запальне мікрооточення, яке здатні створювати макрофаги, може стимулювати ангіогенез і допомагати раковим клітинам уникнути імунного відторгнення [12,13,22-25]. Були виявлені різні схеми метилювання ДНК між типовим і асоційованим з пухлиною мікрооточенням, що свідчить про те, що епігенетичні зміни в мікрооточенні пухлини можуть сприяти канцерогенезу [22,23,26-29].

РМЗ представлений такими основними підтипами: люмінальний А (LumA), люмінальний В (LumB), HER2-надекспресуючий (або HER2-збагачений або HER2+), потрійно-негативний рак молочної залози, а також базально-подібний, так званий «нормальний» або нормально-тканинний РМЗ [33,35,36].

Люмінальні пухлини субтипу А та В характеризуються наявністю ER та/або PR і відсутністю HER2, а також мають низьку експресію маркера клітинної проліферації Ki-67 (менше 20%).

Клінічно вони мають низький ступінь злоякісності, повільно ростуть і мають найкращий прогноз із меншою частотою рецидивів і вищим рівнем виживаності. Ці карциноми мають високу чутливість до антигормональної терапії (медикаментозна або хірургічна абляція, тамоксифен або інгібітори ароматази) і більш обмежену чутливість до хіміотерапії [37]. З цієї причини, згідно з рекомендаціями Європейського товариства медичної онкології (ESMO) і Національної комплексної мережі онкологічних захворювань США (NCCN), у цій групі рекомендується використовувати генетичні платформи, щоб визначити, яким пацієнтам буде корисна хіміотерапія з точки зору ризику рецидиву та потенційно можливого рівня виживаності [38-40]. Люмінальні В пухлини мають вищий ступінь індексу проліферації і гірший прогноз порівняно з люмінальними А [41-43].

Коли РМЗ поширюється на інші органи, він стає найважчим типом захворювання, значно збільшуючи пухлинний тягар і часто призводячи до летальних наслідків [30,45,46,50].

Метастазування РМЗ — це каскад процесів, який починається з локалізованої інвазії у навколишні тканини, продовжується проникненням у кровоносні або лімфатичні судини і завершується розсіюванням пухлинних клітин у віддалених органах [47-49]. Прогресування первинного раку, ангіогенез, інвазія ракових клітин, інвазія у лімфатичні та кровоносні судини, екстравазація у віддалений орган, а також колонізація та ріст метастатичних пухлин — все це послідовні етапи процесу метастазування [31,52,53]. До 5%

осіб з РМЗ вже мають дистанційні метастатичні вогнища на момент встановлення діагнозу, що робить хворобу часто невиліковною навіть за сучасних варіантів лікування. У 10–15% пацієнток розвиваються віддалені метастази впродовж перших трьох років. Більше того, приблизно одна третина хворих на РМЗ, які без ураження лімфатичних вузлів на момент діагностики, може мати віддалені метастази [32-34].

1.2. Стратегія лікування РМЗ на сучасному етапі

Операція зі збереженням молочної залози і мастектомія з негайною реконструкцією або без неї є загальноприйнятими місцевими методами лікування раннього інвазивного раку молочної залози [54]. Із збільшенням використання високоефективної хіміотерапії та таргетної терапії операції стали менш масштабними та менш травмуючими, а показники виживаності підвищилися [55]. За даними літератури в останні роки доведено, що застосування органозберігаючих оперативних втручань не погіршує показники безрецидивної, 3, 5 річної та загальної виживаності хворих в порівнянні з радикальними операціями і значно підвищує індекс якості життя [54-56].

У сучасній практиці хірургічне втручання має на меті видалення первинної пухлини і уражених лімфатичних вузлів, тим самим надає важливу інформацію про стадію захворювання, ступінь лікувального патаморфозу [56]. Органозберігаючі хірургічні втручання можна проводити у більшості пацієнток з пухлинами <5 см, за умови, що груди достатньо великі для подальшого досягнення задовільного косметичного результату. При малих розмірах грудей актуальна передопераційна ХТ, внаслідок чого розмір пухлини зменшується і пацієнтка стає операбельною з точки зору органзберігаючої операції. Мастектомія в свою чергу показана при великих первинних пухлинах, пухлинах, що вражають шкіру або грудну стінку, при мультифокальному раку, запальному раку молочної залози та пацієнткам, які не можуть пройти опромінення [57]. При мультифокальному та

мультицентричному розташуванн пухлин також можливе органзберігаюче, реконструктивне лікування - сосок чи шкірозберігаюча мастектомія з одномоментною або відтермінованою реконструкцією власними тканинами або імплантами.

Секторальна резекція або лампектомія [58] передбачає висічення частини тканини молочної залози з краєм здорової тканини. Розріз може відрізнятися залежно від розташування пухлини та бажаного косметичного ефекту: зазвичай вони є циркумареоллярними, радіальними або вздовж шкірної складки грудей. Косметичні результати (дефект тканин , видимі рубці, асиметрвля) залежать від кількості видаленої тканини молочної залози порівняно з тканиною що залишилася, а також від збереження соска.

Проста мастектомія (РМЕ за Маденом) включає висічення всієї молочної залози з шкірою та САК. Обсяг збереженої шкіри може змінюватися в залежності від того, чи планується реконструкція, і від типу реконструкції. Мастектомія із збереженням сосків (шкіро або сосокзберігаюча мастектомія) є відносно новою модифікацією простої мастектомії, при якій шкіра та сосково-ареоллярний комплекс зберігається, а тканина молочної залози висікається через певні розрізи згідно з попередньою розміткою [59]. Модифікована радикальна мастектомія поєднує просту техніку мастектомії з видаленням пахвових лімфовузлів і передбачає для цього подовження розрізу у пахову ділянку [60].

Хіміотерапія давно зайняла міцні позиції в лікуванні РМЗ - це зумовлено, насамперед, тим, що згідно з сучасними уявленнями, РМЗ вже на ранніх стадіях є системним захворюванням і потребує комплексного лікування [61]. Накопичений великий досвід показує, що поліхіміотерапія (ПХТ) уповільнює або попереджує розвиток місцевого рецидиву, покращує виживання хворих з метастатичним ураженням регіонарних лімфовузлів, покращує якість життя та подовжує його тривалість при розповсюдженому пухлинному процесі [39,40,61,64]. Установлено, що за останні десятиріччя тривалість життя

хворих на РМЗ значно зросла, насамперед, внаслідок широкого впровадження в практику лікування захворювання поліхіміотерапії.

Передопераційна хіміотерапія (неoad'ювантна) – призначається для зменшення первинної пухлини, щоб з'явилася можливість видалення утворення із збереженням грудей.

Післяопераційна хіміотерапія (ад'ювантна) необхідна для профілактики та лікування метастазів та профілактики їх появи в майбутньому.

При не великих пухлинах (T1-2), відсутності метастазів, або початковому метастазуванні у регіонарні лімфатичні вузли (N0-1), хворим з гормончутливими пухлинами (Люмінальний А/В молекулярні підтипи) призначається ад'ювантна хіміотерапія. В подальшому антигормональна терапія: менструючим жінкам - тамоксифен з виключенням функції яєчників (медикаментозна - Диферелін , Золадекс або хірургічна абляція), жінкам в менопаузі - інгібітори ароматази (Летрозол, Аромазин)[39,61,64].

Усім хворим з люмінальним А/В молекулярним підтипом, великим розміром пухлини (T>2) метастазами в регіонарні лімфовузли і (або) несприятливими прогностичними факторами (високий індекс проліферації Ki-67, низькі показники ER ,PR рецепторів) показано проведення 6-8 курсів системної ПХТ за стандартними схемами (АС, АС+Т, Т щотижневі введення в монорежимі, в комбінації з препаратами платини, моноклональними антитілами та інші). Антигормональна терапія, менструючим жінкам виключається функція яєчників. При наявності HER2/new рецептора - моноклональні АТ, інгібітори HER2 рецепторів (Герцептин , Трастузумаб) [39,61]. Ад'ювантна хіміотерапія найбільш ефективна у пацієток у пременопаузі з метастазами в пахвові лімфовузли (забезпечує зниження 5-річної летальності на 30%) [40,64].

Поліхіміотерапія ефективніша за монотерапію, особливо у групі хворих з місцевим метастатичним раком молочної залози. Шість - вісім курсів ПХТ за стандартними схемами протягом півроку - оптимальний за ефективністю і тривалістю метод лікування. При великих розмірах пухлини, Люмінальному

В, HER2/new позитивному, тричі негативному молекулярному підтипі, високому Ki-67, місцево-розповсюдженому РМЗ- показана неoad'ювантна ПХТ з подальшою оцінкою ефекту і рішенням питання про проведення хірургічного лікування, комплексної або комбінованої терапії з урахуванням ступеня лікувального патоморфозу, наявності мутацій в генах BRCA1,2 PALB2 CHEK2 [64]. Основні схеми поліхіміотерапії при I-II стадії (T1-2). Відсутності або початковому метастазувані в регіонарні лімфовузли (N0-1). Люмінальному А/В молекулярному підтипі пухлини.

- Антрацикліни (Доксорубіцин, Епрубіцин, Адрибластин) з Циклофосфамідами (Ендоксан) АС - 6 курсів - класична схема при Люмінальному А/В молекулярному підтипу пухлин II ст.

Хворим з високим ризиком розвитку рецидиву Молекулярним В підтипом, Високими показниками індексу проліферації - Ki-67 та місцево розповсюдженим процес рекомендуються наступні схеми:

- 4 курси АС та 12 курси Т – Таксани в схемі щотижневого введення (Доцетаксел Паклітаксел) можливо з додаванням препаратів платини (цисплатин, карбоплатин). За необхідністю моноклональні антитіла (Кітруда) [64,65]

Променева терапія як компонент комбінованого лікування відіграє важливу роль у лікуванні РМЗ. У рандомізованих дослідженнях показано [66] , що проведення променевої терапії при ранньому РМЗ вірогідно збільшує тривалість безрецидивного періоду (включаючи в першу чергу місцеві рецидиви: іпсен, контрлатеральна молочна залоза та регіонарні метастази: аксілярні лмфовузли , а при розповсюджених формах – сприяє збільшенню тривалості життя пацієнток і покращенню його якості.

У клінічній практиці застосовуються такі методики променевої терапії:

- Передопераційне (неoad'ювантне) опромінення, спрямоване на підвищення абластичності операції, курс великофракційного передопераційного опромінення на молочну залозу і зони регіонарного метастазування (РВД 5 Гр, 5 фракцій, СВД 25 Гр). Неoad'ювантне

опромінення при РМЗ застосовуємо перед онкореконструкціями, щоб запобігти післяопераційним ускладненням.

- Післяопераційна (ад'ювантна) променева терапія, спрямована на профілактику місцевих рецидивів - після видалення пухлини і пахвових лімфовузлів проводиться курс променевої терапії на зону молочної залози та зону аксиллярних лімфатичних вузлів, при виявленні в них метастазів (РВД 2-2,5 Гр, 5 фракцій, СВД 37,5 - 40 Гр) [66,67]

Паліативна променева терапія проводиться при місцево-розповсюдженому РМЗ (Т4), при наявності віддалених метастазів (М1) з метою стабілізації та регресії процесу, та (РОД 2-2,5 Гр, 5 фракцій, СОД до 60 Гр) [68,69].

Як самостійний метод лікування дистанційна променева терапія застосовується при РМЗ рідко і при існуванні таких спеціальних показань:

- наявність абсолютних протипоказань до хірургічного лікування;
- відмова хворої від хірургічного лікування;
- неоперабельні форми РМЗ [69,70].

З початку 70-х років у якості ад'ювантної гормонотерапії у менструюючих та пременопаузальних жінок застосовується антиестрогеновий препарат тамоксифен, стандартною добовою дозою якого вважається 20 мг з тривалістю застосування не менше десяти років. Лікування тамоксифеном стало загально прийнятим методом лікування, ефективність якого доведена багатьма рандомізованими дослідженнями [71]. Є відомості, що тамоксифен знижує смертність не тільки завдяки зменшенню імовірності рецидивів і прогресування злоякісного процесу (у тому числі і за рахунок зменшення розвитку захворювання другої молочної залози). Тамоксифен може позитивно впливати на серцево-судинну систему шляхом зниження кількості ліпопротеїдів низької густини і холестерину. Це веде до зменшення ризику інфаркту міокарда і остеопорозів-перелому шийки стегнової кістки [72]. У зв'язку із тривалим застосуванням тамоксифену висуваються застереження, пов'язані з його побічною дією (почастішання

розвитку гіперплазії ендометрію та навіть ендометріальних карцином). Саме тому прийом препарату має супроводжуватись наглядом гінеколога та УЗД ОМТ. При прогресуванні ендометріозу можлива заміна Тамоксифену на Інгібітори ароматази в комбінації з гормональною абляцією у менструюючих жінок. Аналог Тамоксифену - Фарестон нараз не застосовується, так як не довів свою ефективність - скототився термін безрецидивної та загальної виживаності у пацієнок які вживали саме Фарестон в порівнянні з Тамоксифеном[73].

Визнану ефективність у гормонотерапії раку РМЗ у жінок менопаузального віку демонструє застосування інгібіторів ароматази, — як першої і другої лінії гормонотерапії (Летрозол Аромазин). Розрізняють два типи інгібіторів ароматази: I стероїдні інгібітори (форместан, екземестан, атаместан) і II — нестероїдні (аміноглютамід, фадразол, летрозол, анастрозол, ворозол). Інгібітори ароматази активно вивчаються в клініці і впевнено займають своє місце як в ад'ювантній, так і в паліативній гормонотерапії. Антиестрогени не тільки зменшують частоту прогресування злоякісного процесу, але й знижують також ризик виникнення раку другої молочної залози [74,75].

Примітно, що 75% випадків раку молочної залози класифікуються як рак молочної залози з позитивними гормональними рецепторами до естрогену та прогестерону [76]; саме тому ендокринні препарати, такі як селективні модулятори рецепторів естрогену (SERM) та інгібітори ароматази (AI), є основними методами препаратами лікування в цьому класі [77].

Гормональна абляція. У менструюючих жінок при гормонзалежному РМЗ (Люмінальний А В молекулярні підтипи) є необхідним блокувати функцію яєчників на 4 роки загалом. ГА може бути як медикаментозною (Золадекс Диферелін) або хірургічною (оваріоектомія).

Через виявлення ампліфікації гена рецептора епідермального фактора росту людини 2 (HER2) або надмірної мембранної експресії в підгрупі пухлин молочної залози трастузумаб і пертузумаб були створені для

таргетної анти-HER2 терапії [78]. Навпаки, через свою агресивну природу та небагато варіантів щодо можливостей лікування, потрійно-негативний рак молочної залози, який характеризується відсутністю рецепторів ER, PR та HER2, є справжнім викликом для практикуючих онкологів [79].

PM3, як молекулярно різноманітне захворювання проявляє гетерогенність в широкому діапазоні типів клітин із різною морфологією та властивостями. Як уже було наголошено раніше, молекулярні класифікації широко використовуються в клінічній діагностиці, з охопленням комплексною оцінкою рецепторів естрогену (ER), прогестерону (PR), епідермального фактора росту людини 2 (HER2), епідермального фактора росту (EGFR), фактора росту ендотелію судин (VEGFR) і мутації гена раку молочної залози (BRCA).

Отже, і стратегії лікування відрізняються залежно від молекулярного підтипу. Окрім традиційних методів лікування, таких як гормональна (ендокринна) терапія, променева терапія та хіміотерапія, інноваційні підходи зробили свій внесок у підвищення ефективності лікування PM3, насамперед таргетна терапія та імунотерапія [79,80]. Серед них перш за все це моноклональні антитіла, низькомолекулярні інгібітори та кон'югати антитіло-лікарський засіб, а також цільові системи доставки.

Імунотерапевтичні методи, особливо інгібітори імунних контрольних точок, такі як пембролізумаб, виявилися успішними в лікуванні тричінегативного варіанту шляхом використання імунної системи пацієнта для боротьби з пухлиною [79,80].

Моноклональні антитіла, низькомолекулярні інгібітори, кон'югати антитіло-лікарський засіб та імунотерапія є частиною швидко зростаючого ландшафту цільових варіантів лікування раку молочної залози. Діючи на клітини з надлишковою експресією HER2, моноклональні антитіла, такі як трастузумаб, змінили на краще результати лікування раку молочної залози HER2+ і підвищили рівень виживання. Застосування молекул-інгібіторів, таких як палбоцикліб і рибоцикліб, підвищило показники ефективності

лікування HR+ метастатичного РМЗ шляхом перешкоджання CDK4/6 під час контролю клітинного циклу [81]. Імунотерапія з використанням білка програмованої клітинної смерті 1 (PD-1), започаткувала новий підхід до лікування раку молочної залози шляхом посилення імунної відповіді організму проти пухлинних клітин [81].

На відміну від хіміотерапії, яка використовує свою токсичність для безпосереднього знищення ракових клітин, імунотерапія базується на принципі контролю сигналів клітинного росту та посилення або стимулювання природної імунної відповіді для боротьби з раковими клітинами. Тому, розуміючи такі можливості, можна було б прагнути уникнення тривалого лікування, щоб зменшити побічні ефекти шляхом перепрограмування імунної системи [82,83].

Для активації Т-клітин необхідний не тільки перший сигнал, що забезпечується антигенною стимуляцією, але й другий сигнал від ко-стимуляції та цитокінів. Таким чином, імунні контрольні точки функціонують як супресори в імунній системі, модулюють імунну відповідь, підтримують самостійкість, уникають надмірної активації системи та запобігають пошкодженню аутологічних тканин [84]. Це подвійне розпізнавання має важливе значення для підтримки імунного гомеостазу, а також використовується раковими клітинами для придушення протипухлинних Т-клітинних відповідей, уникаючи при цьому аномальної активації імунної системи. Інгібітори імунної контрольної точки (ICI) були використані для розробки ліків, які могли б реактивувати імунну систему для презентації антигену та вбивати пухлинні клітини. Програмована смерть-1 (PD-1) і цитотоксичний Т-лімфоцитний антиген 4 (CTLA-4) є першими рецепторами контрольних точок, які пропонують широкий спектр перспектив для імунотерапії. Однак вони відрізняються за механізмом ослаблення активації Т-клітин. CTLA-4 посилюється після лікування Т-клітинного рецептора (TCR) і пригнічує активацію шляхом послаблення позитивної ко-стимуляції CD28, тоді як PD-1 індукується після активації,

щоб послабити передачу сигналу TCR та пригнітити проліферацію та виживання Т-клітин шляхом рекрутування тирозинфосфатази при зв'язуванні з його лігандами PD-L1 або PD-L2 [85,86].

Що стосується раку молочної залози, білок PD-L1 експресується у 20–30% пацієнток, причому тричі негативний РМЗ демонструє найвищу конститутивну експресію, що робить цей рецептор перспективним в напрямі протипухлинних досліджень [87]. Наприклад, окермі дослідження продемонстрували, що атезолізумаб, схвалений FDA як антитіло проти PD-L1, посилює цитотоксичність і апоптоз, опосередкований Т-клітинами при тричі негативному РМЗ з високою експресією PD-L1 [88].

Т-клітинна терапія химерним антигенним рецептором (CAR) на основі антитіл, відома як адаптивна клітинна терапія, передбачає генетичну модифікацію клітин-господарів для експресії протипухлинних Т-клітинних рецепторів або химерних антигенних рецепторів, що призводить до протипухлинної реакції. CAR є синтетичним рецептором, який складається з позаклітинних одноланцюгових варіабельних фрагментів, трансмембранних доменів, мотивів активації імунорецепторів на основі тирозину та костимулюючих сигналів [89-91]. При РМЗ важливо обирати оптимальні пухлиноспецифічні або пухлиноасоційовані антигени для посилення аутоімуногенності пухлини та успішної адаптивної Т-клітинної терапії [91,92].

З розвитком імунотерапії раку, як-от інгібіторів імунних контрольних точок і адаптивного перенесення клітин, поступово виникла необхідність у попередньо сенсibilізованих пухлинних антигенах, активації довгострокової імунологічної пам'яті та збільшенні кількості пухлинно-реактивних Т-клітин і, як наслідок, відбулася поява вакцин проти раку. Серед імунотерапевтичних стратегій протипухлинні вакцини — це в першу чергу активні імунні підходи, які підсилюють протипухлинні імунні відповіді через перенесення пухлинних антигенів, що активують аутологічні імунні клітини пацієнта. На сьогоднішній день найбільш широко використовуваними протипухлинними

вакцинами є пептиди, отримані з пухлинних антигенів, тоді як інші типи включають дендритні клітини (ДК) і вакцини на основі ДНК [93,94].

Вакцини на основі пептидів відносно нескладно синтезувати, вони економічно вигідні та мають незначні побічні ефекти. Наприклад, гліколіпідно-пептидні кон'юговані вакцини для активації цитотоксичних Т-клітинних відповідей [94], здатні затримували ріст пухлини молочної залози та перешкоджали метастазам пухлини в легені в експериментальній моделі метастазування.

Крім того, оскільки дендритні клітини (ДК) обробляють і представляють антигени Т-клітинам, дослідники виділили незрілі ДК з периферичної крові хворих на рак і стимулювали їх сумісними антигенами та цитокінами. Після цього зрілі ДК були повторно введені для запуску надійної протипухлинної імунної відповіді [94,95].

Дослідники ІЕПОР імені Р.Є.Кавецького НАН України та Національного інституту раку[96] проаналізували результати використання у хворих на РМЗ II стадії протипухлинної аутовакцини (ПАВ), яку виготовляли шляхом обробки аутологічних пухлинних клітин продуктами синтезу *B. subtilis* 7025 і дійшли висновку, що застосування ПАВ ефективне у хворих, які мали інфільтративно-долькову та інфільтративнопротокову структуру РМЗ.

Для імунологічного моніторингу у вакцинованих хворих на РМЗ доцільно використовували реакцію гіперчутливості уповільненого типу і показники активності нейтрофільних гранулоцитів. В іншому дослідженні [97] показано, що імунізація за допомогою ксеногенної протипухлинної вакцини (КПВ), виготовленої на основі курячих ембріональних білків високої молекулярної маси і цитотоксичного метаболіту *B. subtilis* В-7025 призводила до уповільнення росту первинних пухлин, пригнічення метастазування та суттєвого подовження тривалості життя експериментальних тварин з карциномою Ерліха, а цитотоксична активність лімфоцитів та макрофагів у вакцинованих тварин перевищувала таку у невакцинованих.

1.3. Особливості клінічного перебігу РМЗ, прогресія та метастазування

Епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП) – це феномен, при якому втрачається полярність епітеліальних клітин і міжклітинна згуртованість, необхідний для ініціації метастазів при раку молочної залози [98]. Плейотропні фактори транскрипції, включаючи SNAIL, TWIST і зв'язування E-box з цинковим пальцем (ZEB), є важливими молекулами в регуляції ЕМП. Нещодавні дослідження продемонстрували, що втрата експресії або дисфункція GATA3 сприяє метастазам раку молочної залози шляхом регуляції білків сімейства G9A та метастатичного пухлинного антигену (MTA), рекрутованих ZEB2 [99]. Запальні цитокіни, включаючи інтерлейкін-6 (IL-6), відіграють істотну роль у метастазуванні раку молочної залози. IL-6 зв'язується з комплексом IL6R/gp130 і активує сигнали Янус-кінази (JAK) для активації сигнальних перетворювачів і активаторів транскрипції 3 (STAT3) [99,100]. У свою чергу, передача сигналів IL-6/STAT3 сприяє EMT, регулюючи рецептор естрогену α (ER α), який є важливим для метастазування раку молочної залози [101]. Крім того, білки клітинної поверхні відіграють важливу роль у метастазуванні раку молочної залози. Взаємодія між раковими клітинами та клітинною поверхнею опосередковує клітинну адгезію та інвазію для ініціювання метастазування [102,103]. Наприклад, метатерин, гіперекспресія якого спостерігається більш ніж у 40% випадків раку молочної залози, зв'язується з легеневою судинною мережею С-кінцевим сегментом позаклітинного домену [104], що призводить до поганих клінічних результатів лікування РМЗ через віддалене метастазування.

Імунні клітини та пухлинне мікрооточення також можуть сприяти метастазам РМЗ. Пухлиноасоційовані макрофаги (ТАМ) відіграють різні ролі в різних сигналах мікросередовища. При РМЗ ТАМ, підтип макрофагів M2, часто активується IL-4, що секретується CD4⁺ Т-клітинами [106]. ТАМ-секретуючі цитокіни, включаючи хемокіни, фактори запалення та фактори росту, тісно пов'язані з метастазами шляхом збільшення адгезії до позаклітинного матриксу (ECM) [108]. Таким чином, ці імунні клітини та

секретовані фактори можуть бути мішенями для лікування метастатичного РМЗ.

За даними різних досліджень, 5-річна відносна виживаність становить 91%, а через 10 і 15 років виживаність становить 84% і 80% відповідно для всіх стадій разом [109]. 5-річна виживаність при первинній локалізації пухлини становить 99%, регіонарній – 86%, метастатичній – 17% [110]. Показники виживаності з часом збільшуються (74,8% у 1975 році проти 91,3% у 2015 році), ймовірно, завдяки ранньому виявленню за допомогою мамографічного скринінгу та покращеним методам лікування, таким як використання більш цілеспрямовані терапії [109,110].

Метастатичний РМЗ вважається невиліковним клінічним захворюванням; основою лікування є системна терапія, спрямована на продовження виживаності пацієнтів. Прогноз при цьому захворюванні значно покращився завдяки введенню кількох цитотоксичних препаратів і таргетної терапії. Сьогодні майже 44% пацієнтів проживуть 3 роки, а близько 20% — щонайменше 5 років [110, 111].

Прогресування пухлини можна розглядати як еволюцію великої популяції генетично та епігенетично відмінних і нестабільних індивідуумів у постійно мінливому середовищі [112,113]. З цієї точки зору статистично більш імовірно, що всі або більшість пухлинних клітин мають потенціал до еволюції, а домінантний клон може відрізнятися на різних стадіях прогресування пухлини, а також до і після лікування. Ця гіпотеза, мабуть, суперечить висновкам про те, що профілі експресії генів первинних інвазивних пухлин та їхніх відповідних метастазів (у лімфатичних вузлах або віддалених) більш схожі один на одного, ніж на інші пухлини тієї ж клінічної та патологічної стадії [114].

Стадіювання пацієнтів з раком молочної залози дає багато інформації про прогноз для окремого пацієнта. Як згадувалося вище, при раку молочної залози визначення стадії проводиться відповідно до системи класифікації TNM [51, 115]. Ця система використовується при багатьох типах раку і

поділяє пухлини на стадії 0–4 залежно від прогресування пухлини. Факторами, які беруться до уваги, є розмір первинної пухлини (T), поширення на локорегіонарні лімфатичні вузли (N) і віддалені метастази (M). Стадія 0 — це неінвазивний рак, такий як протокова карцинома *in situ* та часточкова карцинома *in situ*. Рак молочної залози 1–3 стадії (без віддалених метастазів) вважається виліковним, тоді як рак молочної залози 4 стадії (з віддаленими метастазами) вважається невиліковним. На цей факт вказує мета-аналіз прогнозу 36 клінічних випробувань із метастатичним захворюванням, що показує середню загальну виживаність 21,7 місяця [115].

У жінок з пухлиною <1 см 5-річна виживаність досягає 99%. Проте пацієнти з пухлинами 3–5 см виживали 86%. Крім того, середній час до появи віддалених метастазів був коротшим для більших пухлин порівняно з меншими пухлинами. Не забуваємо що значну роль в прогнозах становить молекулярний підтип пухлини. За даними авторів [116], запровадження програми мамографічного та ультразвукового скринінгу збільшило кількість рано виявлених пухлин. Таким чином, середній розмір пухлини на даний момент становить <2 см.

Визначення молекулярного підтипу у хворих на РМЗ має вирішальне значення, оскільки воно диктує різні терапевтичні підходи і забезпечує конкретні клінічні результати. Це призводить до індивідуального лікування для кожної пацієнтки на основі молекулярних характеристик РМЗ. Наразі точна медицина раку молочної залози охоплює діагностику, лікування та профілактику захворювань, враховуючи генетичний склад кожного пацієнта. Що стосується лікування, медична спільнота всеосяжно усвідомлює безальтернативну перспективу індивідуалізації. Це означає, що кожна пацієнтка з діагностованим РМЗ отримує найбільш достовірний діагноз і цілеспрямовану терапію, адаптовану до профілю захворювання, що значно підвищує виживаність пацієнток і знижує витрати системи охорони здоров'я [117,118].

Щодо метастазів, у дослідженні клінічної характеристики пацієнтів з метастатичним раком молочної залози, які вижили більше десяти років, приблизно у 70% пацієнтів спочатку були метастази в одному органі без істотних відмінностей між підтипами [119,120]. Легені були найпоширенішим місцем метастазування, з ураженням 46,4% усіх пацієток і 61,1% пацієток у підгрупі гормональних рецепторів/HER2. Після цього спостерігався рецидив лише у віддалених лімфатичних вузлах (37,3%), який був більш поширеним у підгрупах HER2+, і кісткові метастази у 30% усіх пацієток дослідження [121]. На жаль, у країнах, що розвиваються, значна кількість випадків раку була діагностована на пізній стадії.

У 30% хворих, в яких діагностовано РМЗ, зрештою виникнуть метастази [122]. Локуси метастазування включають кістки, легені, печінку та мозок, причому кістки є найпоширенішою локалізацією [123]. Серед усіх пацієнтів, які померли від раку молочної залози, приблизно 73% мають ураження кісток на момент смерті, що становить найвищий відсоток ураження кісток серед усіх видів раку [124].

Незважаючи на те, що шлях кожної пацієнтки унікальний, від розвитку ранньої стадії раку молочної залози до маніфестації злоякісного процесу в кістках може пройти до 30 років [125,126].

Незважаючи на найкращі терапевтичні зусилля, у деяких пацієток з первинним раком молочної залози відбувається прогресування до метастатичного захворювання. На відміну від інших підтипів раку молочної залози, у яких ризик рецидиву знижується через 5 років після встановлення діагнозу, ризик рецидиву HR-позитивного раку молочної залози залишається стабільним від 5 років до принаймні 20 років, причому у деяких пацієток рецидив спостерігався через три десятиліття після первинного діагнозу [127].

Таким чином, тривалий моніторинг є важливою частиною менеджменту хворих на РМЗ: рекомендується регулярний збір анамнезу і фізикальне обстеження кожні 4-6 місяців впродовж перших 5 років після первинної терапії, а потім щорічно разом із щорічною мамографією [128]. Однак навіть

відсутність будь-яких клінічних ознак метастатичного захворювання, оцінки сироваткових онкомаркерів, рутинного сканування кісток, сканування комп'ютерної томографії (КТ), сканування магнітно-резонансної томографії (МРТ), сканування позитронно-емісійної томографії (ПЕТ) або ультразвукового дослідження можуть не забезпечувати підвищення показників виживаності [129,130].

Серед пацієнток, у яких розвивається метастатичний РМЗ, у 45% виникають початкові метастази в кістках, що значно частіше, ніж у легенях (19%), печінці (5%) або мозку (2%) [131]. Пацієнтки з метастатичним РМЗ в кістках можуть мати біль у кістках, патологічні переломи, симптоми компресії спинного мозку, включаючи нетримання сечі та м'язову слабкість, або гіперкальціємію, що може спричинити нудоту та зміну психічного стану.

Після звернення пацієнтки до клініки необхідно зібрати анамнез, провести фізикальний огляд і аналізи крові, включаючи тести функції печінки та рівні лужної фосфатази. Лужна фосфатаза є сироватковим маркером як гепатобіліарної патології, так і обміну та мінералізації кісткової тканини [132-134]. Специфічна для кісток лужна фосфатаза експресується на клітинній поверхні остеобластів, а рівень сироватки корелює з підвищеною активністю остеобластів, яка виникає як при остеобластних, так і при остеолітичних ураженнях [135]. При остеобластичних ураженнях це підвищення корелює з місцевою стимуляцією остеобластів, тоді як при остеолітичних ураженнях воно є вторинним по відношенню до місцевого руйнування кістки та подальшого компенсаторного формування кістки.

Одним із найважливіших прогностичних факторів є стан лімфовузлів (N). Згідно з даними SEER, 5-річна загальна виживаність становить 92% для пацієнток з неураженими регіонарними лімфовузлами, 81% з ураженими 1–3 лімфатичними вузлами та 57% при виявленні метастазів у чотирьох і більше лімфовузлах. Наявність мікрометастазів і ізольованих ракових клітин у регіонарних лімфовузлах також має несприятливе прогностичне значення [136,137].

Розмір первинної пухлини є важливим прогностичним фактором. Дані SEER показують, що 99% жінок із захворюванням, обмеженим молочною залозою, і пухлиною менше 1 см, 89% з пухлиною розміром 1-3 см і 86% з пухлиною 3-5 см проживуть 5 років. Крім того, пухлина з початково великими розмірами привертає до ураження регіонарних лімфовузлів [138,139]. Поточна ознака T4 за класифікацією TNM, тобто інвазія шкіри або грудної стінки, також пов'язана з гіршим прогнозом.

Не менше прогностичне значення мають гістологічний тип і ступінь гістологічної злоякісності. Менш поширені види раку, такі як тубулярний, папілярний і медулярний, мають кращий прогноз з 10% ризиком рецидиву при тривалому спостереженні [139]. Дослідження показали, що несприятливе прогностичне значення пов'язане з низькою диференціацією пухлини (G3). Однак чітко не встановлено, який вплив має помірна диференціація на прогноз (G2) [140].

Незважаючи на прогрес у хірургії та лікуванні раку молочної залози на ранніх стадіях, приблизно у 20% пацієнток спостерігається рецидив [141], а широка поширеність неминуче створює ризик рецидиву іпсилатеральної пухлини молочної залози (ІПМЗ). Під час 10-річного спостереження було відмічено, що ІПМЗ виникали приблизно у 5%–10% пацієнток, які проходили повністю курс лікування включно з променевою терапією. Незважаючи на збільшення рівня виживаності пацієнтів з рецидивом раку молочної залози з часом, кілька досліджень показали, що виникнення ІПМЗ пов'язане зі збільшенням ризику системних метастазів і зниженням виживаності пацієнток [141,142]. Вагому роль в появі місцевих рецидивів після або під час лікування є наявність або відсутність мутації в генах BRCA1 BRCA2 PALB2 CHEK2 – спадковий рак. Так як наявність даної мутації значно збільшує відсоток місцевих рецидивів не залежно від методу і об'єму лікування первинної пухлини.

Як і багато інших солідних пухлин, РМЗ починається як місцеве захворювання, але може поширюватися на лімфатичні вузли та віддалені

органи, перетворюючись на метастатичний рак молочної залози, також відомий як прогресуючий РМЗ або РМЗ IV стадії. Метастази РМЗ спричиняють більшість смертей; фактично, у 10–15% пацієнток в кінцевому підсумку з'являються віддалені метастази протягом трьох років після виявлення первинної пухлини[143]. Також варто додати, що нерідко прояв мікрометастазів спостерігається у віддалених ділянках більше ніж через 10 років після початкового виявлення пухлини.

Таким чином, хворі на РМЗ мають ризик розвитку метастазів протягом усього життя [144,145].

Однією з характерних рис метастазування раку є те, що багато типів пухлин схильні переважно колонізуватися в певних тканинах або органах. РМЗ притаманний органоспецифічний тип дисемінації та переважно метастазує в кістки (частота виникнення 47%–60%), печінку (частота виникнення 19%–20%), легені (частота виникнення 16%–34%) і мозок (частота виникнення 10%–16%)[146].

Лікування пацієнток із пізньою стадією раку створює клінічні проблеми через ускладнення, які виникають у міру прогресування захворювання. Метастази в кістках є поширеною проблемою, з якою можуть зіткнутися хворі на рак, і наразі не існує ефективних ліків для лікування таких осіб. Рак молочної залози у вигляді метастазів часто поширюється на кістки, спричиняючи значне погіршення прогнозу перебігу захворювання та якості життя пацієнток [147].

Кістка є високоактивною та динамічною тканиною і вважається сприятливим середовищем для розвитку раку [148]. Роль остеобластів і остеокластів у процесі ремоделювання кісток і те, як їх взаємодія змінюється під час прогресування метастазів, має вирішальне значення для розуміння патофізіології цього захворювання [149, 152] (Рис. 1.1).

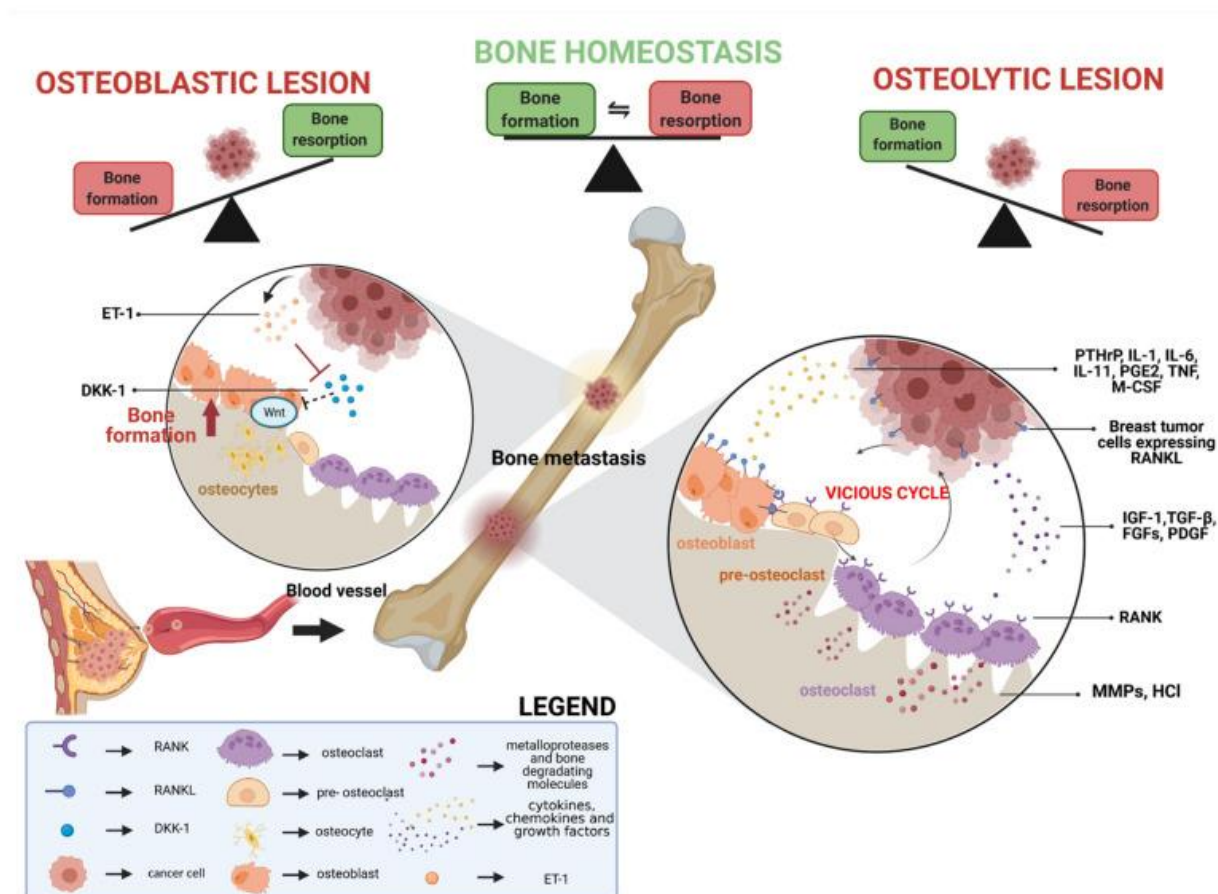


Рисунок 1.1 Метастазування РМЗ в кісткову систему: остеобластичні та остеолітичні вогнища [152].

Розуміння процесу ремоделювання кісток і системних елементів, які регулюють цей процес, а також клітинних змін, які відбуваються під час прогресування кісткових метастазів, матиме вирішальне значення для відкриття нових ефективних ліків, які у осяжному майбутньому зможуть впливати на ремоделювання кістки та активність регулюючих факторів, таких як гормони та цитокіни [150,151].

1.4 Роль міРНК у персоніфікованій діагностиці, клінічному моніторингу і прогнозі перебігу РМЗ

МіРНК – це некодуючі короткі послідовності РНК, які складаються з 22-26 нуклеотидів, мають складну структуру і залучені до регуляції експресії генів [153]. За останні десять років інтерес вчених до вивчення міРНК в онкології істотно збільшився [154]. МіРНК мають свої унікальні переваги для їх використання у молекулярній діагностиці, такі як легкість виявлення і специфічність для неопластичних процесів. Це прогнозовано відкрило новий напрям досліджень, який доповнив арсенал виявлених вже традиційних біомаркерів РМЗ, підвищуючи точність і специфічність діагностики, особливо коли їх поєднують у панелі [153,154]. Деякі мікроРНК пов'язані з розвитком, прогресуванням і відповіддю пухлини на терапію [155, 156].

Важливо, що міРНК були пов'язані з усіма стадіями метастатичного каскаду при РМЗ [57]. МіРНК мають значну перспективу як діагностичні біомаркери РМЗ, розкриваючи такі переваги, як неінвазивне виявлення, моніторинг відповіді на лікування в реальному часі та потенціал для персоналізованих підходів в лікуванні [158]. Інтеграція профілювання міРНК з іншими клінічними та молекулярними маркерами може підвищити точність і достовірність діагностичних і прогностичних моделей [159].

Автори зазначають, що міРНК мають терапевтичний потенціал у лікуванні РМЗ, оскільки вони можуть модулювати експресію генів і відновлювати нормальні функції клітин [160]. Націлювання на конкретні нерегульовані міРНК може призвести до розробки інноваційних методів лікування, хоча необхідно вирішити такі завдання, як розробка ефективних систем доставки та проходження планових доклінічних та клінічних досліджень.

На сучасному етапі відомо, що міРНК відіграють дві важливі ролі — проонкогенну (онко-міРНК) та онкосупресорну. Багато міРНК, орієнтовані на гени-супресори пухлини, надмірно експресуються при РМЗ. Ці мікроРНК

регулюють пухлинний процес, проліферацію, інвазію та міграцію злоякісно трансформованих клітин [154].

Зокрема продемонстровано, що міРНК-21 сприяє трансформації та розвитку РМЗ шляхом придушення програмованої експресії білка-4 клітинної смерті (Programmed Cell Death 4 — PDCD4) [155]. міРНК-155 виступає в ролі онкогенної мікроРНК, її пригнічення запобігає проліферації та індукує апоптоз клітин [155-157]. Також було показано, що міРНК-200a пригнічує апоптоз клітин шляхом зв'язування гена транскрипційного регулятора білка 1 (Yes associated protein 1 — YAP1) [158]. Нарешті міРНК-27b, націлена на ST14, посилює інвазію та міграцію клітин РМЗ.

В літературі також представлені дані про міРНК, які можуть інгібувати прогресування раку — пригнічують проліферацію та селекцію пухлинних клітин за допомогою блокування онкогенів та генів, що сприяють росту пухлинного вузла. Повідомлялося, що багато міРНК, такі як родина let-7, міРНК-26b, міРНК-124, міРНК-125a/125b, міРНК-205 та міРНК-206, діють як міРНК-супресори пухлини. міРНК-26b інгібує ріст клітин тричі негативного РМЗ, впливаючи на домен DEP і знижуючи регулювання експресії FOXM1 [159]. міРНК-26b полегшує зупинку клітинного циклу G0/G1 та інгібування клітинної проліферації за рахунок націлювання на кіназу CDK8 [160-163].

МіРНК можуть визначати окремі етапи канцерогенезу, розвитку метастазів або хіміо/радіорезистентності, і таким чином прогнозувати стан для пацієнтів з конкретним молекулярним підтипом РМЗ [163-167] (Рис.1.2).

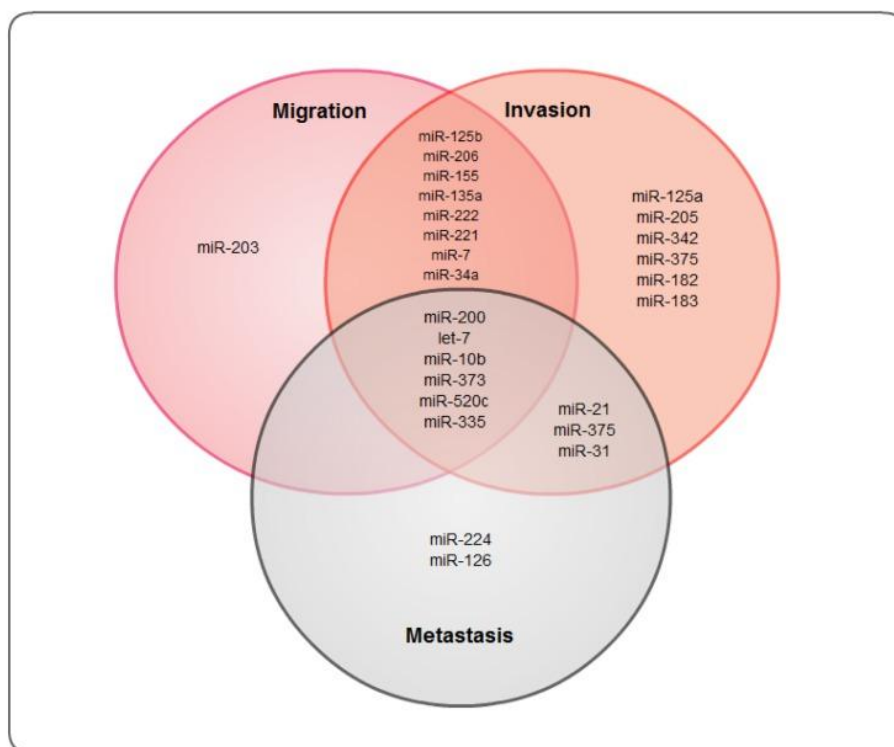


Рисунок.1.2 Діаграма Венна, що показує перекриваючу роль кількох міРНК у міграції, інвазії та метастазуванні раку молочної залози [154].

Гетерогенність пухлин молочної залози опосередкована кількома сигнальними шляхами і вимагає інтегрованих підходів для діагностики та прогнозу клінічного перебігу онкологічного захворювання. У цьому аспекті експресія міРНК може бути не тільки показником складності молекулярного профілю раку молочної залози, але також простим у використанні прогностичним маркером. Так наприклад, у дослідженні [168] підтверджено обернену кореляцію міРНК-200b і міРНК-122 зі стадією захворювання, а також встановлено, що сироваткові рівні мікроРНК-122 і -200b є аналогічними рівням у ракових клітинах і можуть бути використані як мінімально інвазивні маркери прогресування РМЗ.

Дослідження показали достовірно вищі показники 5-річної загальної виживаності у хворих на РМЗ: Люмінального А підтипу — за умови низького рівня експресії пухлино-асоційованих міРНК-10b і міРНК-126 та високого рівня експресії міРНК-34a; Люмінального В підтипу — за високих показників експресії міРНК-34a, міРНК-126 та міРНК-320a; HER2/неу-

позитивного підтипу — за високих рівнів експресії міРНК-181а, -205 та -320а; базального підтипу — за низького рівня експресії міРНК-126 та високого — міРНК-205 [169].

Виявлено, що 3-річна безрецидивна виживаність була вищою у хворих на РМЗ: Люмінального А підтипу — за низьких показників експресії міРНК-10b і міРНК-126, високого рівня експресії міРНК-34а; Люмінального В підтипу — за високих показників експресії міРНК-34а, міРНК-320а та низького рівня експресії міРНК-126; HER2/неу-позитивного підтипу — за високих рівнів експресії міРНК-181а, -205 та -320а; базального підтипу — за низького рівня експресії міРНК-126 та високого — міРНК-205 .

Дослідниками обґрунтовано можливість використання показників експресії міРНК у пухлинних клітинах для прогнозування агресивності перебігу різних молекулярних підтипів РМЗ та оцінки ризику розвитку рецидиву захворювання [169] .

В іншій роботі встановлено, що рівень експресії пухлино-асоційованих міРНК-21 та -221 прямо корелює з такими показниками злоякісності РМЗ, як стадія пухлинного процесу ($r = 0,54$ і $0,51$ відповідно), розмір новоутворень ($r = 0,53$ і $0,50$ відповідно), наявність метастазів у РЛВ ($r = 0,58$ і $0,57$ відповідно), ступінь диференціювання пухлин ($r = 0,56$ і $0,57$ відповідно) та їх молекулярний підтип ($r = 0,59$ і $0,61$ відповідно) Безрецидивна 3-річна виживаність хворих на РМЗ була достовірно меншою у пацієнтів з рівнями експресії міРНК-21 $>11,1$, міРНК-221 $>3,5$, міРНК-125b $<1,7$ у.о. у пухлинних клітинах. [170].

З іншого боку, виявлені міРНК, які пов'язані з блокуванням метастазування, зокрема міРНК-141 і міРНК-200с. МіРНК, які сприяють метастазуванню, виявляють значну надмірну експресію, в той час як ті, які пригнічують цей процес, виявляються зниженими. Виявлення надмірної експресії таких міРНК, спільно з онкомаркерами (наприклад, TGF- β , VEGF, СЕА або СА15-3), може допомогти у постановці правильного діагнозу до початку

розповсюдження пухлини, що полегшить лікування, підвищить ефективність та зменшить його наслідки [171-173].

Загалом велика кількість міРНК, такі як міРНК-638, міРНК-17, мікроРНК-20b, міРНК-342, міРНК-484, міРНК-21, міРНК-24, міРНК-27, міРНК-23 і міРНК-200, також беруть участь у регуляції хіміорезистентності через різноманітні генетичні мішені [174-176]. Резистентність до хіміопрепаратів гіпотетично можна пояснити тим, що у пухлині існують деякі проонкоклетини, які “спочивають”, вони є стійкими до хіміопроменевої терапії, оскільки звичайні методи лікування можуть впливати лише на швидко проліферуючі клітини. Це дозволяє резистентним клітинам вижити, викликати пухлинний ріст, метастазувати або спричиняти рецидиви пухлини [177,178]. В такому контексті слід звернути увагу на мікроРНК, що пригнічують пухлину, як-от міРНК-342, міРНК-16, міРНК-214 і міРНК-128, і міРНК, що сприяють розвитку пухлин, зокрема міРНК-101 і міРНК-106-25, кластерно регулюють клітинний цикл, апоптоз, трансформацію епітеліальних клітин у клітини з мезенхімним фенотипом та інші шляхи формування стійкості до хіміотерапії [179-181].

Аналіз літературних джерел дав можливість в деякій мірі систематизувати ці питання у контексті патогенезу РМЗ. Ряд міРНК вже був ідентифікований як достовірний біомаркер РМЗ, зокрема міРНК-30a, міРНК-361-5p, міРНК-27a та міРНК-193b [182]. Дослідження показують, що зміни в рівні сироваткових міРНК можуть бути пов'язані з ризиком рецидиву РМЗ [183,184]. Повторна поява раку є серйозною загрозою для онкохворих, оскільки вона асоціюється з поганими наслідками, такими як віддалені метастази та висока смертність [185].

Необхідно визнати, що рецидив РМЗ є окремою нозологічною сутністю, яка представляє кілька проблем, відмінних від тих, що виникають при первинному місцевому захворюванні. Крім того, рецидив РМЗ має безліч особливостей, що впливають на результат, і лікується відповідно до

конкретних протоколів, які значно відрізняються від тих, що використовуються в первинних умовах.

При рецидиві захворювання результат залежить від кількох клініко-патологічних та імуногістохімічних характеристик, включаючи метастатичний інтервал, а також загальні результати лікування у конкретної пацієнтки [185,186].

Серед багатьох постмастектомічних розладів найбільш серйозними проблемами є розвиток рецидивів (7,9%), віддалених метастазів (15,5%) і розвиток запальних ускладнень (34%), навіть протягом першого року після початку лікування.

Місцевий рецидив – пухлинний процес, що виникає в клітковині грудної стінки після радикальної операції з приводу раку молочної залози в області квадрата, нижнього краю ключиці, дуги ребер, середньої та бічної пахвових ділянок як вихідна пухлина. Регіонарний рецидив – це поява метастазів у регіонарних лімфовузлах після хірургічного або комбінованого лікування незалежно від лімфодисекції [186]. Після виконання радикальної мастектомії місцевий рецидив виникає протягом трьох місяців або десятиліть. Крім того, якщо рецидив виникає протягом двох років після мастектомії, прогноз захворювання дуже несприятливий. Частота місцевих рецидивів у пацієнтів з I-IIA стадіями становить 5–10% випадків впродовж п'яти років після хірургічного лікування, а через десять років після лікування досягає 25–30% [187].

Багато факторів ризику пов'язують з рецидивом РМЗ, включаючи вік (молоді жінки мають більше шансів на рецидив), генетичні та клінічні характеристики пухлини [188]. Незважаючи на те, що питання рецидиву РМЗ гостро стоїть у клінічній практиці, на сьогодні досі не розроблено доказового молекулярного методу виявлення рецидиву [189,190]. На основі багатьох досліджень наукові кола прийшли до заключення про те, що серед широкого переліку відкритих міРНК, лише невелика їх кількість з високою вірогідністю може служити такими прогностичними маркерами для

моніторингу рецидиву захворювання. Так, серед пацієнтів з рецидивом тричі негативного РМЗ виявлено збільшення циркулюючих міРНК-18b, міРНК-20a, міРНК-30d, міРНК-103, міРНК-107, міРНК-223 та міРНК-652, тоді як у безрецидивних хворих залишався високим рівень міРНК-32 та міРНК-101 [191,192]. В кінцевому рахунку на основі статистичних методів досліджень зроблено висновок, що тільки міРНК-18b, міРНК-103, міРНК-107 і міРНК-652 мають доказовий рівень прогностичної значущості в оцінці ризику рецидиву та смертності у когорті пацієнтів з тричі негативним РМЗ [193-195]. На інвазію пухлини також впливає міРНК-92a, яка належить до сімейства міРНК-17-92, і може сприяти проліферації пухлини і метастазуванню, регулюючи шлях PI3K/Akt/mTOR та взаємодіючи з Bcl-2, Bim та білками p53 [196,197].

Основною причиною смертності хворих на РМЗ є прогресування захворювання з метастазуванням у віддалені внутрішні органи та скелет [198]. За частотою метастазування три локалізації є безсумнівними лідерами: кістки, печінка та легені. Наявність метастатичного ураження кісток може різко вплинути на якість життя хворої через посилення болю, порушення рухливості, компресію спинного мозку, патологічні переломи. Пацієнтки з пізніми стадіями РМЗ рано чи пізно страждатимуть від метастазів в кістках у міру прогресування хвороби, а симптоми, пов'язані з метастазами, часто є першою ознакою захворювання [199]. Деякі пацієнтки можуть мати патологічні переломи та пов'язані з ними ускладнення: обмеження рухливості, сильний біль, неврологічні порушення [200].

Хворі на рак з метастатичними ураженнями кісток відчують два типи болю. Перший – це постійний неінтенсивний біль ниючого або пульсуючого характеру, що має тенденцію посилюватися. Другий – це простріл, імпульс або різкий епізодичний біль, викликаний рухом або зміною положення хворого у просторі; такий різновид болю є більш гострим за своєю природою і часто проявляється у відповідь на зміщення ураженої кістки [201].

При метастатичному захворюванні кісток найтяжчий ступінь інвалідності може бути викликаний переломами довгих кісток і поширенням пухлини на спинний мозок. Патологічні переломи виникають внаслідок незначних механічних ушкоджень, що може серйозно вплинути на якість життя хворих на РМЗ [202-204] .

В сучасних умовах не виключеною є така ситуація, при якій після завершення протокольного курсу спеціалізованої терапії пацієнтка у певному сенсі залишається на деякий час без постійного спостереження, адже контрольні диспансерні огляди відбуваються через відносно довгі проміжки часу.

Тому онкологи, усвідомлюючи небезпеку метастазування, можуть використовувати сучасні інструменти персоніфікованої діагностики [205] і передбачати локалізацію переломів при метастатичному ураженні кісток, а значить і заздалегідь запланувати профілактичну операцію, щоб не допустити розвиток будь-яких можливих ускладнень [206, 207].

1.5 Перспективи удосконалення персоніфікованого лікування хворих на РМЗ

Не зважаючи на велику кількість досліджень, які вибірково доводять зв'язок міРНК з онкопроцесом, на сьогодні досі не зрозуміло які саме зміни експресії міРНК викликають проліферацію ракових клітин та сприяють інвазивному росту. В загальній картині цієї проблеми розглядається два варіанти перерозподілу експресії – гіперекспресія та зниження експресія. При цьому виявляється, що рівні експресії в тканині пухлини та кількість циркулюючих у сироватці крові міРНК не завжди мають пряму лінійну позитивну залежність. Для кожного з цих варіантів вже описано великий перелік міРНК. Так, надмірну експресію окремих міРНК (міРНК-9, міРНК-10b, міРНК-29a, міРНК-96, міРНК-146a, міРНК-181, міРНК-373, міРНК-375, міРНК-520c і міРНК-589) та кластерів (міРНК-221/222) виявлено у тканинах пухлини і з певним доказовим рівнем доведено їх зв'язок з розвитком РМЗ

[208,209]. Альтернативно з цим, знижена регуляція та низька експресія інших генів (міРНК-30а, міРНК-31, міРНК-34, міРНК-93, міРНК-125, міРНК-126, міРНК-146а, міРНК-195, міРНК-200, міРНК-205, міРНК-206, міРНК-503 і let-7) також відіграють важливу роль у патогенезі РМЗ, оскільки при такому варіанті молекулярних змін експресії геному у клітинах залози втрачається механізм регуляції клітинного циклу, блокування проліферації у пухлині, і, як наслідок, це становить основні механізми у прогресії РМЗ [210,211]. Одним з таких показових досліджень є аналіз змін експресії міРНК-30а при РМЗ, де було встановлено закономірність при якій збільшення стадії та ступеня злоякісності раку характеризувалося поступовим зниженням рівня експресії міРНК-30а [212,213].

Очевидно розвиток РМЗ не визначається підвищеною експресією та гіперекспресією однієї або кластеру міРНК. Аналіз багатьох досліджень вказує на те, що значне зниження експресії також є самостійним предиктором онкопроцесу. Так, знижені рівні міРНК-17-5р і міРНК-20а-5р, які, як було продемонстровано, відіграють важливу роль в інвазії та міграції ракових клітин через пригнічення Wnt/ β -катеніну, у пацієнтів з Люмінальним А підтипом РМЗ [214,215]. Натомість рівень експресії міРНК-16, міРНК-21, міРНК-155, міРНК-195 були підвищені у цій же категорії хворих [216,217]. Тобто деякі міРНК можуть потенційно бути додатковим маркером у специфічній диференціації підтипів РМЗ, в додаток до імуногістохімічного дослідження. Для такого підходу важливо звернути увагу на деякі найбільш вивчені міРНК. Надзвичайно важливим в діагностичному плані виявився рівень міРНК-155. Встановлено, що ризик РМЗ з зміненим рівнем міРНК-155 майже у п'ять разів вищий порівняно з пацієнтками із непідтвердженим РМЗ [218-220].

У дослідженнях встановлено певний вплив вікової залежності на захворюваність та особливостями перебігу і лікування РМЗ у різних категоріях хворих [3,4,9,13,17,23,221]. Молодий вік в патогенезі РМЗ розглядається як прогностично поганий [5,41,42,309,310]. Дійсно, молоді

пацієнтки з РМЗ зазвичай мають більші та низькодиференційовані пухлини, інвазію лімфатичних вузлів, надекспресію HER2 та відсутність експресії гормонального рецептора. Однак біологічні механізми, які сприяють розвитку РМЗ у молодих жінок, поки що недостатньо досліджені. Відомо, що спадковий РМЗ (наприклад, мутації BRCA1 і 2) також часто виникає у молодих жінок [13,101,102,224]. Цікаво, що поширеність мутацій, які пов'язані з високою інвазивністю РМЗ є меншою у популяції азіатського походження [19,103,104]. Біологічні фактори, які обумовлюють схильність до РМЗ у молодих жінок, зокрема з урахування етнічного фактору, потребують детального вивчення [105,113, 225]. Предметом суперечок є унікальність виникнення РМЗ у молодих пацієнток і чи варто розглядати молодий вік в якості окремого прогностичного чинника [5,196,107,111,226].

Залежність розвитку різних молекулярних типів РМЗ від настання менопаузи, безумовно також існує. За результатами порівняльного аналізу жінок хворих на РМЗ у вікових категорій до 35 років, 36-40 років, 41-50 років і старше 50 років виявлено наступну залежність: виявлено достовірний зв'язок розвитку РМЗ Люмінального А типу у старших вікових групах, починаючи з 41 року, і HER2+ тип РМЗ у хворих, старших за 50 років. Натомість Люмінальний В та тричі негативний тип РМЗ виявлено як до настання менопаузи, так і у менопаузальному віці [28,52,108,227].

Показано, що частота діагностування ER-позитивного РМЗ у жінок молодого віку та старше 50 років з 80-х років минулого сторіччя зростає майже в 1,7 рази. У ER-позитивного, HER2-негативного РМЗ стадії пухлинного процесу негативно корелювала з рівнями експресії ER та PgR. Прогноз для пацієнтів з ER-позитивним, HER2-негативним захворюванням значно покращився з часом завдяки прогресу в ад'ювантній терапії [67,77, 228].

Профілювання експресії генів може допомогти з'ясувати деякі закономірності між фактором віку та клінікою захворювання на молекулярному рівні. Так було підтверджено, що рівні міРНК-20a-3p, міРНК-

30b-5p, miRНК106b, miRНК191 і miRНК-301a в плазмі демонструють значне вікове зниження. Решта miRНК, включених у дослідження валідації (miRНК-21, miRНК-210, miRНК-320b, miRНК-378, miRНК-423-5p, let-7d, miRНК-140-5p, miRНК-200c, miRНК-374a, miRНК376a) всі показали схожі тенденції. Цікаво, що один перелік miRНК не показав диференціальної експресії у хворих на РМЗ старшого віку, тоді як інший навпаки (let-7d, miRНК-20a-3p, miRНК-301a, miRНК-374a, miRНК-376a, miRНК-191, miRНК-200c, miRНК-30b-5p, miRНК-140b-5p і miRНК-106b) був зниженим у літніх пацієнток порівняно з молодими [228,311,312].

Кілька досліджень виявили кореляцію між такими молекулярними маркерами, як miRНК-21, miRНК-9, let-7, miRНК-205, miRНК-200, miRНК-126 і miRНК-335 та виникненням пухлин з високою метастатичною та проліферативною здатністю, які, мають гірший прогноз [229,230].

Науковий інтерес представляє мікроРНК-21, яку розглядають як самостійний серологічний маркер онкопроцесу, так як її рівень у крові зростає і він вірогідно може відображати виникнення і розвиток РМЗ [231,232]. Ранні спостереження показали, що мікроРНК-21 пов'язаний з РМЗ, а в останні роки дослідження доводять її роль у багатьох типах злоякісних пухлин. МікроРНК-21 є онкогеном, що стимулює проліферацію, інвазію, метастаз та запобігає апоптозу клітин [233-237].

Подібно до мікроРНК-21, регуляторні зв'язки клітинного циклу були відкриті для miRНК-10b, яка регулює метастазування через взаємодію з геном HOXD10 під контролем фактора транскрипції TWIST. MiRНК з таким регуляторним впливом контролюють багато генів, що сприяють появі пухлин та агресивним метастадам [13,19,94,218].

Інші автори оцінювали результати експресії miRНК у тканинах пухлин та їх рівень у сироватці і прийшли до висновку, що не кожна з miRНК має позитивну залежність у обох досліджуваних біологічних зразках хворих з РМЗ. Так, пацієнти з рецидивом мали високі рівні miRНК-340 у пухлині та у сироватці крові, тоді як miRНК-195-5p, miRНК-17-5p, miRНК-93-5p і miRНК-

130a-3p, були знижені в сироватці крові пацієнтів з рецидивом. І тільки рівні міРНК-340-5p, міРНК-17-5p, міРНК-130a-3p і міРНК-93-5p достовірно були пов'язані з рецидивом РМЗ [239-241].

Також встановлено, що експресія мікроРНК-25-3p була підвищена в тканинах пухлини порівняно з відповідними непухлинними тканинами, а також у сироватці крові хворих, без достовірної залежності щодо віку хворих. У *in vitro*, на культурі клітин з нокдауном мікроРНК-25-3p встановлено знижену проліферацію онкоклетин шляхом регулювання експресії гену TOB1, доведено зв'язок мікроРНК-25-3p з регуляцією клітинного циклу та інвазією пухлинних клітин [67,77,242,243,249].

МіРНК-31 була знайдена в вищих концентраціях у хворих з базальноподібною формою РМЗ, що свідчить про її ключову роль у регулюванні поділу стовбурових клітин молочної залози і формуванні пухлин за допомогою активації сигнальних систем. Також було виявлено, що мікроРНК-31 сильно експресується в пухлинах молочної залози та клітинах молочної залози *in vitro*, і вона може сприяти їхній проліферації [111,242,243].

Відомі спроби виявити залежність експресії міРНК від молекулярного типу пухлини [123,240]. Так, у випадку HER2-позитивної пухлини встановлено дуже високу специфічність щодо мікроРНК-4728, диференціальну експресію кластера міРНК-99a/let-7c/ міРНК-125b у випадку пухлин Люмінальний А та В типу. Також виявлено позитивну залежність між високою експресією цього кластера міРНК та кращою загальною виживаністю пацієнтів з пухлинами Люмінального А РМЗ [242-244].

Недавні дослідження показали, що міРНК-139 модулюють стволовість ембріональних стовбурових клітин, в тому числі й ракових. Результати вивчення властивостей проонкоклетин у клітинних лініях і тваринних моделях довели, що міРНК-139 пригнічував проліферацію з мезенхімальними ознаками, що позначилося у зниженні здатності до міграції та інвазивного росту [242,243]. Важливу роль міРНК-139-5p як інгібітора

метастазування РМЗ, довели в дослідженнях й інші вчені. МіРНК-139-5p була виявлена з низьким рівнем експресії в різних підтипах раку молочної залози, включаючи Люмінальний А і В, HER2-позитивний та базальноподібний рак. Було статистично доведено зниження рівня експресії міРНК-139-5p при всіх вищезазначених типах РМЗ і підвищення його рівня в екзосомах мезенхімальних стовбурових клітин [243,244].

Дослідниками встановлено позитивну кореляцію між міРНК-155 і міРНК-373, рівень яких збільшувався у пацієнтів із HER2-негативними пухлинами, мав тенденцію щодо ER та PR позитивних пухлин. Рівень міРНК-155 і міРНК-10b у сироватці крові підвищувався у пацієнтів з РМЗ із великими розмірами пухлини та великим ураженням лімфатичних вузлів. На противагу цьому експресія міРНК-34a знижувалася у хворих з неметастазуючими пухлинами і не залежить від молекулярного типу РМЗ, як і міРНК-10b [112,113,244,312]. Такі дослідження є важливим кроком у розумінні РМЗ і розробці індивідуальних підходів до лікування, але для оцінки використання міРНК як надійних біомаркерів для раннього виявлення РМЗ у жінок різних груп потрібні більш системні дослідження. Гіперекспресія міРНК-155 у клітинах РМЗ затримує ріст пухлини та збільшує протипухлинну імунну інфільтрацію [244,245].

Аналіз великої групи пацієнтів із тричі негативним РМЗ показав, що підвищені рівні міРНК-155 сприяють покращенню репарації ДНК, таким чином, покращуючи загальну виживаність пацієнток [245].

У інших дослідженнях, експресія міРНК-155 виявляється значно підвищеною в HER-2-позитивних пухлинах порівняно з HER-2-негативними [245,247]. Ген HER-2 вважається одним з найбільш важливих проонкогеном, пов'язаних з РМЗ.

Високий рівень міРНК-155 спостерігався у пацієнтів з РМЗ 3 стадії. Підвищена експресія мікроРНК-155 мала статистично значущий зв'язок з наявністю метастазів у лімфатичних вузлах майже у 1/2 обстежених хворих. Крім того, результати вказують на те, що рівень мікроРНК-155 не має

суттєвої залежності від віку пацієнтів, незалежно від того, чи мають вони РМЗ, чи ні. Одночасно з цим, відмічено відносно незначну залежність від стадії TNM, проте вона сильно асоційована з розповсюдженням метастазів у лімфатичних вузлах та статусами p53 і гормональних рецепторів у пухлинах [245-248].

Раннє виявлення хворих на РМЗ, у яких немає відповіді на неoad'ювантну хіміотерапію (НПХТ), має вирішальне значення для оптимізації стратегій та покращення результатів лікування [247,248] (Рис.1.3).

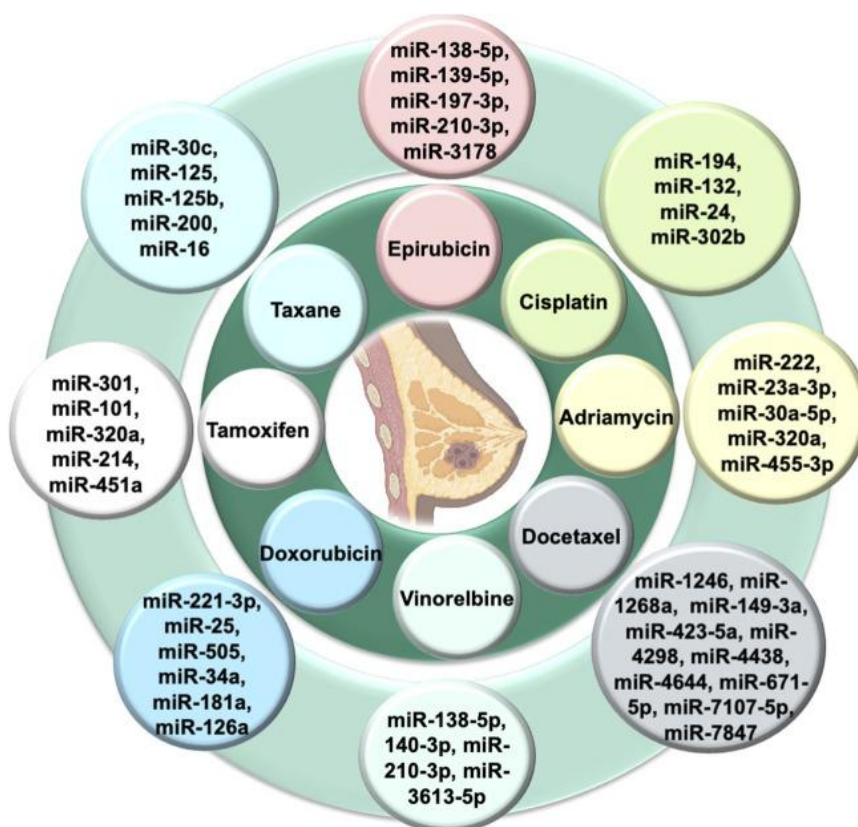


Рисунок.1.3 мікроРНК, експресія яких є маркером нечутливості до хіміотерапії [247].

Таким чином, роль міРНК в розвитку РМЗ стає все більш очевидною і цей зв'язок відкриває можливості для розробки нових діагностичних методів, прогностичних факторів та терапій, що зможуть поліпшити результати лікування та якість життя пацієнтів. МіРНК регулюють численні сигнальні

шляхи і регуляторні мережі, тому й невеликі зміни у їх експресії можуть значно впливати на прогресування цього захворювання. Можливість впливу на міРНК, будь то їх зменшення чи посилення експресії, видається перспективною для розробки нових, більш ефективних та індивідуально підходящих методів лікування, покращення результатів терапії і передбачення реакції пацієнтів на різні види лікування [249-252].

В цілому молекулярні дослідження і виявлення кореляцій між рівнями експресії міРНК та клінічною картиною РМЗ вказує на важливість цього напрямку в лікуванні онкохворих, особливо у молодих жінок [253-256]. На сьогодні не виникає сумніву в тому, що міРНК беруть участь у розвитку РМЗ, включаючи ріст і метастазування пухлини, існує зв'язок їх експресії з різними типами раку, інвазивністю пухлин і здатністю до метастазування [257, 258]. Збільшену експресію різних міРНК в тканинах пухлин порівняно з нормальними тканинами, а також встановили зв'язок між експресією міРНК, метастазами в лімфатичних вузлах та рівнем рецепторів естрогену і прогестерону (ER і PR) встановлено у багатьох дослідженнях, але ці роботи часто не в повному обсязі дають можливість одержати вичерпну інформацію [259,260].

Варто також відзначити, що різні дослідницькі групи, які вивчають одну й ту ж патологію, приходять до подібних висновків щодо обраного біомаркера, що підсилює переконання у потенціалі міРНК як засобу діагностики раку та інших захворювань. Проте, щоб з'ясувати механізм надмірної експресії однієї або широкої панелі мікроРНК при РМЗ, необхідно провести обширні мультицентрові дослідження з аналізом багатьох показників [261,262].

На думку дослідників, для підвищення ефективності лікування РМЗ слід активно вивчати ефективність хіміотерапії в поєднанні з аналізом рівнів мікроРНК, які відіграють важливу роль у модуляції відповіді на терапію, наприклад, міРНК-21, міРНК-34а, міРНК-195, міРНК-200с, міРНК-497 та інші або розглядати панелі аналізу цілого кластеру міРНК з найбільш

доказовим кореляційним зв'язок щодо клінічної картини РМЗ [51,263]. Модуляція міРНК є ключовим елементом для підсилення ефективності терапії раку. Наприклад, підвищена експресія міРНК-21 у клітинній лінії лейкемії, стійкої до даунорубіцину, спричиняє стійкість до цього препарату, тоді як пригнічення цієї міРНК підсилює його цитотоксичність. Також, експресія міРНК-34а, яка є необхідною для підтримки проонкоклетин, знижується в клітинних лініях, стійких до адриаміцину, і її регуляція може підвищити чутливість до терапії як *in vitro*, так і *in vivo* [264,265]. Загалом, модуляція міРНК має критичний вплив на регулювання хіміорезистентних проонкоклетин, клітин на шляху епітеліально-мезенхімальної трансформації та відповідь на терапію раку. Оскільки ці клітини часто пов'язані з рецидивами РМЗ, модифікація міРНК у поєднанні з терапією може знизити ризик наступних рецидивів та покращити результати лікування [51,266,267].

Зважаючи на те, що стійкість до ліків залишається основною проблемою в клінічному контексті і призводить до рецидивів та метастатичного поширення різних видів раку, нові методи лікування набувають надзвичайної важливості. Відкриття міРНК розширило наше розуміння молекулярних процесів, що лежать в основі раку, і створило можливість розробки нових, більш ефективних терапевтичних підходів. У власних дослідженнях ми зосереджуємось на нових відкриттях, які стосуються ролі міРНК у розвитку різних типів раку молочної залози та виявленню можливо зв'язку з чутливістю пухлин до хіміотерапії.

Розвиток штучного інтелекту та перспективи його впровадження в онкологічній мамології охоплюють мамографічний томосинтез, застосування моделей прогнозування ризиків та цифрову обробку додаткових методів візуалізації, включаючи магнітно-резонансну томографію та 3D моделювання [268]. Штучний інтелект ймовірно здатний розкрити нові можливості цитопатологічної діагностики, оцінки біомаркерів генетичних та епігенетичних змін для синтетичного аналізу відповіді на лікування та прогнозу клінічного перебігу РМЗ [269]. Молекулярні підтипи РМЗ і їх

чутливість або резистентність до тих чи інших лікарських засобів суттєво впливають на результати лікування хворих на РМЗ. Незважаючи на те, що молекулярна класифікація пухлин міцно увійшла в клінічну практику, стандартні схеми ХТ, ГТ, ІТ і таргетної терапії, що існують на сьогодні, не завжди виправдовують сподівання на результативність лікування [270,271].

Усе більше дослідників обирають стратегію застосування персоналізованого підходу до лікувальної тактики у хворих на РМЗ з використанням комплексу лікувальних впливів у конкретної пацієнтки після вивчення чутливості пухлини до засобів ХТ, застосування таргетної терапії, того чи іншого профілю мікроРНК [5,6,7,272-274].

Пандемія коронавірусної хвороби (COVID-19) спричинила додаткові складні проблеми у наданні допомоги онкологічним хворим, труднощі у продовженні звичайного лікування раку. Відвідування лікарень, обстеження та всі способи лікування мають потенційні ускладнення, які піддають пацієнтів ризику. У цій ситуації існує потреба в удосконаленні підходів до лікування хворих на РМЗ, щоб проводити його не тільки ефективно, але й безпечно [275-277]. Персоніфікація лікування онкохворих набуває ще більшої актуальності в умовах військового стану, коли на перебіг захворювання можуть впливати психосоматичні наслідки травмуючих подій [278].

Таким чином, гетерогенність РМЗ і виділення підтипів цього захворювання, засноване на клініко-морфологічних, молекулярно-генетичних, епідеміологічних та інших підходах, а також помітні відмінності у факторах ризику дозволяють говорити, що питання щодо лікування хворих на РМЗ остаточно не вирішено. Тим не менш сучасний рівень знань про молекулярні механізми виникнення і розвитку РМЗ, його чутливості або резистентності до різних препаратів і впливів дозволяє розробляти перехід від усереднених стандартних схем терапії до призначення лікування відповідно до індивідуальних особливостей пацієнтки і біологічних характеристик пухлини.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна характеристика хворих на РМЗ

Матеріалом дослідження були результати аналізу амбулаторних карт і історій хвороб 120 хворих на люмінальний А (n=40) та люмінальний В (n=80) РМЗ Т1-Т2 N0 M0 та Т1-Т2 N1 M0, G1-2 у віці від 29 до 75 років, яким було встановлено діагноз вперше та яким проводилося лікування у КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр» в період 2015–2020 рр. Хворі включались у дослідження добровільно, що засвідчували підписанням інформованої згоди схваленої на засіданні комісії з питань етики ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України. Дослідження перспективно-ретроспективне, не рандомізоване.

Критерії включення в дослідження: жінки, хворі на люмінальний А та люмінальний В молекулярно-біологічні підтипи РМЗ; імуногістохімічно підтверджений молекулярно-біологічний підтип пухлини; пухлини менше 5 см у найбільшому вимірі; відсутність віддалених метастазів.

Для вивчення показників експресії міРНК в сироватці крові в дослідження також були включені 47 хворих на РМЗ чотирьох біологічних підтипів (люмінальний А і В, Her2+, тричінегативний) I – IV стадій та 18 здорових жінок.

Досліджувану групи склали пацієнтки, яким досліджували чутливість до хіміопрепаратів до початку спеціалізованого лікування (перед НПХТ), n = 30: люмінальний А – 20 хворих, люмінальний В – 40 хворих.

В контрольну групу увійшли пацієнтки, яким не досліджували чутливість до хіміопрепаратів (n = 60), люмінальний А – 20, люмінальний В – 40. Досліджувана і контрольна групи ідентичні за стадією захворювання, за молекулярним підтипом пухлини і віковими показниками.

2.2. Методи обстеження хворих на злоякісні пухлини молочної залози

Для діагностики РМЗ та визначення розповсюдженості пухлинного процесу використано комплекс діагностичних заходів. Проаналізовані результати обстеження хворих на РМЗ на догоспітальному етапі в консультативній поліклініці та в умовах онкологічної клініки. Всім хворим на РМЗ проведено клінічне, лабораторне, інструментальне (ендоскопічне, ультразвукове, рентгенологічне) і морфологічне обстеження. На догоспітальному етапі для хворих з підозрою на РМЗ обов'язковим стандартом обстеження були наступні діагностичні заходи:

1. Клінічні обстеження: в усіх хворих аналізували скарги та анамнез захворювання, а також застосовували загальноприйняті методи клінічного обстеження: огляд, перкусія, аускультція, пальпаторне дослідження органів черевної порожнини і доступні для пальпації групи периферичних лімфатичних вузлів.
2. Лабораторні дослідження включали: загальний аналіз крові з визначенням лейкоцитарної формули і числа тромбоцитів; біохімічний аналіз крові (визначення концентрації загального білка, сечовини і креатину, білірубіну, ферментів печінки, глюкози, Д-димер); серологічний аналіз крові (визначення RW, резус-фактора, групи крові, HbSAg); загальний аналіз сечі; визначення рівня СА-125 та за показанням інших пухлинних маркерів у сироватці крові, електрокардіограма.
3. Інструментальні методи дослідження:

Пацієнтам за клінічними показаннями в передопераційному періоді проводилося ендоскопічне обстеження верхніх відділів травного тракту езофагогастродуоденоскопії (ЕГДС) на апараті фірми "Fuginon" (Gastroscope FG-1Z) і "Olympus" з оглядом стравоходу, шлунка і 12-палої кишки.

Комп'ютерне томографічне дослідження з внутрішньовенним посиленням зображення проводилося на апараті фірми "General Electric ST MAX" і "Select SP Marconi". Для візуалізації розмірів первинної пухлини,

наявності або відсутності регіонарних та віддалених МТС. Контролю ефективності НПХТ, НПТ.

Радіологічні – остеосцинтиграфія, радіоізотопна діагностика з ^{99m}Tc пертехнетатом для виявлення та інтерпретації змін в кістках скелету.

Рентгенологічні дослідження : ММГ, КТ-онкоскринінг з контрастуванням (ОГП ОЧП ОМТ кісткове вікно). Мамографія на апараті Amulet Innovality з томосинтезом- для первинної діагностики та контролю ефективності неoadьювантного лікування.

При підозрі на рецидив хвороби з метою вибору тактики лікування обсяг обстеження розширювався за показаннями і включав діагностичні заходи, вказані при первинній діагностиці. За параметрами часу розрізняли ранні рецидиви (ремісія довше ніж 6 міс.) і пізні рецидиви (ремісія після 6 міс.). Нами проведено аналіз пізніх рецидивів захворювання, тобто у всіх пацієнток була досягнута повна клінічна ремісія, що продовжувалась більше 6 міс. після первинного комбінованого або комплексного лікування.

4. Ультразвукові дослідження

Для проведення ультразвукового сканування молочної залози використовувався УЗ апарат "GE". з лінійним датчиком, органів черевної порожнини – з конвексним датчиком, органів малого тазу- вагінальний датчик. При ультразвуковому дослідженні оцінювали локалізацію пухлини, відношення до сусідніх органів, стан регіонарних лімфовузлів, ознаки метастазування. Відповідно до рекомендацій BOOЗ (2014) оцінювали ефективність лікування хворих за ультразвуковими ознаками (табл. 2.3).

Таблиця 2.1

Сонографічні критерії ефективності первинного лікування онкологічних хворих (ВООЗ, 2014 р.)

Ефективність лікування	Характеристика пухлинного процесу
Повний регрес (ПР)	Відсутність ознак пухлини
Частковий регрес (ЧР)	Зменшення на 30% і > суми найбільших показників контрольних пухлинних осередків
Стабілізація захворювання (СЗ)	Не спостерігається суттєвих змін, що дозволяють визначити ЧР або ПЗ з моменту початку лікування
Прогресування захворювання (ПЗ)	Збільшення розмірів пухлинних осередків на 20% і > порівняно із сумою найменших показників, зафіксованих на початку лікування, або поява нових пухлинних осередків

Даним сонографічного обстеження хворих надавали велике значення як діагностичному так і допоміжному методу оцінки ефективності лікування хворих на РМЗ.

2.3 Методи морфологічного і морфометричного дослідження пухлин молочної залози

Морфологічна (гістологічна, цитологічна) верифікація РМЗ проведена всім хворим перед початком спеціального лікування у відділі патологічної анатомії Київського міського клінічного онкологічного центру. Використовували класичну обробку пухлин з фіксацією у 10% водному розчині формаліну, зневодненням у спиртах підвищеної концентрації і заливкою у парафінові блоки. Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном і еозином та досліджували у світловому мікроскопі Polyvar-2 фірми "Reichert" (Австрія) при збільшенні 120 x 400.

Лікувальний патоморфоз

Визначення ступеню лікувального патоморфозу [279] проводилось за методом Лушнікова. Лікувальний патоморфоз РМЗ після НПХТ досліджували у 30 хворих. З цією метою з трьох зон пухлини (периферична, проміжна, центральна) вирізали по одному шматочку, які піддавали фіксації. З кожного блоку виготовляли по 3 гістологічних зрізи на трьох рівнях блоку (верхній, середній, нижній), тобто досліджували 27 гістологічних зрізів на кожну пухлину.

2.4. Імуногістохімічний метод дослідження пухлин молочної залози

Для визначення молекулярно-біологічного підтипу РМЗ проведене імуногістохімічне (ІГХ) дослідження рецепторів естрогену (РЕ), прогестерону (РП), HER2/neu і Ki-67 у клітинах РМ з використанням відповідних моноклональних антитіл (МКАТ) фірми (DacoCytomation, Данія). У якості антитіл використовували моноклональні антитіла, які є специфічними до РЕ (клон 1D5), РП (клон PgR636), HER2/neu (клон c-erbB-2) та Ki-67 (клон MIB-1). Для детекції реакції використовували систему візуалізації Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System (Thermo Scientific, USA). Для кількісної оцінки експресії досліджених маркерів використовували метод H-Score за формулою:

$$S = N0 (\%) + 3 \cdot N1 (\%) + 2 \cdot N2 (\%) + 1 \cdot N3 (\%),$$

де S — показник «H-Score», N0 — кількість клітин з відсутньою експресією, N1, N2 та N3 — з низькою, середньою та високою експресією відповідно. Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 1 до 100 балів — низький, від 101 до 200 балів — середній, від 201 до 300 — високий рівень експресії [62].

2.5. Дослідження експресії панелі міРНК у сироватці крові

Для дослідження експресії панелі міРНК у сироватці крові застосовували метод зворотно-транскрипційної полімеразної ланцюгової реакції (ЗТ-ПЛР) у реальному часі на системі виявлення AppliedBiosystems 7500 HT FastReal-Time PCR System з використанням TaqManMicroRNAAssay. Для вимірювання мікроРНК(МікроРНК)рівнів у сироватці крові готували із 300 мкл зразків сироватки за допомогою колонки NucleoSpin miRNA Plasma (Macherey-Nagel, Duren, Німеччина) та набору miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen). Виділення тотальної РНК з сироватки крові проводили за допомогою комерційного набору "miRNA Isolation Kit" (ThermoScientific, USA). Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі „NanoDrop 2000c Spectrophotometer” (ThermoScientific, USA). Ізольовану РНК піддавали зворотній транскрипції за допомогою набору miScript I RT Kit (Qiagen). QRT-PCR проводили за допомогою набору miScript SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Відповідно до методики stem-loopmiRNA RT-PCR [63], було використано універсальний reverseprimer 5' - GTGCAGGGTCCGAGGT – 3' для всіх мікроРНК. Для нормалізації результатів було обрано рівень експресії міРНК RNU48. Середнє для триплікатів граничне значення циклу (Ct) досліджуваної міРНК нормалізували відносно Ct ендogenous контролю. Зміну експресії мікроРНК в певну кількість разів у порівнянні з контролем обчислювали за формулою $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Результати обробляли в програмі Microsoft Excel.

2.6. Визначення чутливості клітин РМЗ до протипухлинних препаратів

Чутливість пухлин до цитостатиків вивчали за допомогою МТТ-тесту. Зразки пухлини після механічної дезагрегації інкубували у культуральному середовищі RPMI-1640 (Sigma) з протеолітичними ферментами протягом 6-8 годин при 37°C. Після інкубації отриману суспензію клітин двічі відмивали у холодному ЗФР та підраховували відсоток загиблих клітин. Потім суспензію клітин у концентрації 1×10^6 клітин/мл розсівали в 96-лункові пластикові планшети та інкубували в стандартних умовах при 37°C за вологих умов з

насиченням повітря 5% CO₂. Після 24-годинної адаптації клітин до умов культивування додавали по 100 мкл розчину протипухлинних препаратів (ендоксан, доксорубіцин, адрибластин, епірубіцин, паклітаксел, доцетаксел, таксотер, карбоплатин, цисплатин). Через 72 години визначалась дегідрогеназна активність клітин з використанням 3-[4,5диметилтіазол-2-1]-2,5-дифенілтетразоліум бромід в МТТ тесті. Цитотоксична активність протипухлинних препаратів оцінювалась за зміною екстинції дослідних проб по відношенню до контролю.

2.7. Методи лікування хворих на злоякісні пухлини молочної залози

2.7.1 Хіміотерапія

В досліджуваних і контрольних групах хворих спеціалізоване лікування проводилося згідно з міжнародними протоколами лікування РМЗ NCCN та ESMO .

Нижче наведені схеми НПХТ. Дози променевої терапії. Та рекомендовані види оперативних втручань при певних стадіях, ІГХ та віку пацієнток.

Загальні схеми ПХТ, які використовували – 6 курсів АС. Або 4 курси АС та 12 курсів Т (методом щотижневого введення).

Курс внутрішньовенної (системної) ПХТ за схемою АС проводили впродовж одного дня. Він включав комбінацію двох препаратів –

-Антрацикліни (доксорубіцин, епірубіцин, адрибластин) з циклофосамідами (ендоксан) АС - 6 курсів - класична схема при Люмінальному А-В молекулярному підтипу пухлин II ст.

Хворим на молекулярний В підтип РМЗ з високим ризиком розвитку рецидиву, високими показниками індексу проліферації Ki-67 та місцево розповсюдженим процесом застосовували наступні схеми:

-4 курси АС та 12 курси Т – Таксани в схемі щотижневого введення (доцетаксел, паклітаксел) можливо з додаванням препаратів платини (цисплатин, карбоплатин).

Методика внутрішньотканинного маркування пухлин перед курсами НПХТ.

Для маркування застосовували Ro- контрастні та УЗ- контрастні мітки. Їх розміщали на відстані 2 мм від визначеного краю пухлини. Ця процедура підвищує точність візуалізації і контролю первинної пухлини після передопераційних курсів ПХТ.

Для пацієнток з пухлиною менше ніж 2 см встановлення міток проводили до початку НПХТ.

У пацієнток з пухлиною більше ніж 2 см мітки розміщували після того як розмір пухлини зменшувався приблизно на 50%.

2.7.2. Методики хірургічного лікування хворих на РМЗ

При виборі обсягів хірургічного втручання ми керувалися тим, що хірургічне лікування, як і раніше, залишається одним з основних методів комплексної терапії РМЗ і базується на двох основних вимогах: радикальність операції і дотримання принципів абластики та антиблаستي. В нашому дослідженні застосовувалися такі обсяги хірургічних втручань.

1.Органозберігаючі

1.1 Лампектомія (секторальна резекція)

1.2. Онкореконструктивні операції:

Онкореконструкція при якій об'єм видаленої тканини молочної залози з пухлиною заміщують власними тканинами – лоскутами на судинних ніжках (TRAM-лоскут (шкірно-м'язовий) – береться з передньої черевної стінки (в нижній частині живота); LD – для реконструкції форми грудей вирізається частинка зі спини в проекції найширшого м'яза; LICAP/MICAP-лоскути – заміщення дефекту шкірно-жировим лоскутом на судинній ніжці. При локалізації пухлини в зовнішніх квадрантах

Онкореконструкції вільними лоскутами - трансплантація лоскутів при яких відбувається відсічення шкірно-жирово клаптя ж прилеглими м'язами та пересічення трофічних судин. Та трансплантація лоскута в ділянку дефекту

молочної залози з формуванням нових анастомозів артерій та вен, для забезпечення трофіка лоскута (трансплантанта) DIEP – застосовується шкірний покрив і жирова клітковина з епігастральної зони, рідше застосовують лоскут сідничної зони та зони гомілки .

Онкореконструкції де дефект тканин заміщають імплантом.

2. Радикальна мастектомія (операція Маддена)

3.Хірургічні втручання на кістках проводили співробітники відділу моніторингу пухлинного процесу та дизайну терапії ІЕПОР ім.Р.Є.Кавецького НАН України в 12 та 3 міських клінічних лікарнях міста Києва.

2.7.3. Методики променевої терапії хворих на рак молочної залози

Основний механізм дії іонізуючого випромінювання – згубний вплив на структуру ДНК клітин, які активно діляться. З цієї причини під час сеансу променевої терапії при раку молочної залози в першу чергу руйнуються онкоклітини, що швидко ростуть, і в меншій мірі — навколишні здорові тканини. Сучасні апарати дозволяють досягти такого фокусування іонізуючого пучка, що пошкодження здорових клітин поза вогнищем ураження мінімальне. Щоб під час променевої терапії (ПТ) попередити виникнення ускладнень з боку найбільш чутливих до радіації здорових тканин, застосовують спеціальні екрани (компенсатори), які їх захищають.

Променева терапія проводилась як монотерапія або в поєднанні з хіміотерапією при малих розмірах пухлини, коли: радикальна операція протипоказана; у післяопераційному періоді для профілактики рецидиву. Особливо у разі органозберігаючих операцій при раку молочної залози; до хірургічного втручання, щоб зменшити новоутворення у розмірах з метою видалення віддалених метастазів.

Також радіотерапію можуть призначити у разі паліативного лікування для полегшення загального стану.

Променева терапія після операції

Сумарну курсову дозу та кількість сеансів при раку молочної залози розраховує онколог-радіотерапевт, виходячи з конкретного типу пухлини, розміру онкоочага та стадії захворювання. У середньому це 28 процедур ЛТ, які проводяться циклами по 5 днів на тиждень (в середньому, 6 тижнів). Проте їхня загальна кількість завжди адаптується до стану конкретного пацієнта.

Загальні правила променевої терапії у післяопераційному періоді:

Мінімальний старт опромінюючих процедур після хірургічного втручання – 3 тижні. Максимальний – не пізніше 8 тижнів. Радіотерапію можна відкласти, якщо вона проводиться у поєднанні з лікуванням цитостатиками. У цьому випадку через небезпеку посилення побічної дії опромінення роблять після хіміотерапії або між окремими курсами.

В нашому дослідженні променева терапія виконувалась на сучасному лінійному прискорювачі - Elekta. Всі схеми ПТ згідно з рекомендаціями NCCN та ESMO.

Схема променевої терапії які застосовувались в дослідженні:

Разова доза на молочну залозу 2.0 Гр. СВД 50 Гр + 10 Гр boost (на ложе пухлини). Boost можливо комбінувати з разовою дозою. Тоді вона буде складатиме 2.3 Гр.

Разова доза на регіонарні асильярні лімфовузли складає 40-46 Гр. Кількість сеансів ПТ - 25 .

2.8. Вивчення вмісту маркерів обміну кісткової тканини

Для моніторингу хворих з підозрою на поширення пухлинного процесу на кісткову систему вивчали вихідний рівень маркерів кісткової резорбції в крові (С-кінцевий телопептид (СТХ), тартратрезистентна кисла фосфатаза ТРКФ-5Ь) і дезоксипіридинолін (ДПД) в сечі та остеогенезу (кісткова лужна фосфатаза (КЛФ), остеокальцин в крові (ОК)).

Концентрація СТХ (нг / мл), а також активність ТРКФ-5b (Од / л), Dkk-1 (пг / мл), (КЛФ (Од / л) і остеокальцин (мкг / л) в сироватці крові визначались за допомогою відповідних тест-систем: Serum Cross Laps (Osteometer), «Bone TRAP» (IDS), «Metra BAP» (QuidelCor.), Human Dkk-1 (Assay Designs) і Osteocalcin «ELISA» (Nordicbioscience).

Визначення ДПД в сечі проводили за допомогою набору «Metra DPD EIA Kit» (QuidelCor.).

За нормальні значення маркерів кісткового метаболізму були прийняті рівні СТХ <0,8 нг / мл, ДПД <8 (нмоль / ммоль креатиніну, ТРКФ-5b <4,2 Од / л, КЛФ <45 Од / л, остеокальцин <11 мкг / л .

2.9. Методи статистичної обробки отриманих результатів дослідження

Для первинної обробки даних використано пакет прикладних програм MS Excel 2010.

Первинна обробка даних включала: відбір даних для проведення аналізу, стандартизацію даних, аналіз однорідності вибірок, визначення типу розподілу. Для статистичного аналізу цифрових даних використано пакет прикладних програм STATISTICA 6.0 for Windows, Stat Soft, Inc., USA. Використовували параметричні та непараметричні критерії, зокрема метод t-критерій Ст'юдента або U-критерій Манна-Уїтні. Достовірність міжгрупових відмінностей проводили за допомогою критерію χ^2 та Краскела-Уолліса.

Кореляційну залежність оцінювали за допомогою рангових кореляцій Гамма та парних кореляцій Пірсона. Показники виживаності хворих аналізували графічно за методом Каплана-Мейєра, для парних порівнянь використовувався *log-rank* критерій, для множинних міжгрупових відмінностей – критерій χ^2 . Статистично достовірними рахували дані при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3

3.1.Безпосередні та найближчі результати лікування хворих на РМЗ

3.1.1.Порівняльна характеристика результатів хірургічних втручань у досліджуваній та контрольній групах

Післяопераційні ускладнення у вигляді сером, запальних змін з нагноєнням післяопераційної рани спостерігались у хворих досліджуваної групи в 13,3% пацієток (8 осіб) , в контрольній групі у 10,0% (6 осіб). Всі ускладнення були ліквідовані консервативними лікувальними заходами.

В досліджуваній групі (n=60) місцеві рецидиви пухлин виникли у 2 (3.3%) пацієток, а у контрольній групі (n=60) – у 5 (8.3%) пацієток. З приводу рецидивів всім хворим були проведені повторні хірургічні втручання в обсязі видалення рецидиву.

У досліджуваній групі впродовж 1-3 років спостереження лімфостаз верхньої кінцівки спостерігався у 2 (3,3%) пацієток. В контрольній групі цей показник склав 17%.

3.1.2.Порівняльна характеристика результатів променевої терапії у пацієнтів досліджуваної та контрольної груп

Різниця проведення спеціалізованого лікування у контрольній та досліджуваній групі полягала не лише у підборі персоніфікованого хіміотерапевтичного лікування, але й у проведенні променевої терапії на різних випромінювачах. В досліджуваних групах опромінення проводили на лінійному прискорювачі, а в контрольних – на кобальтовому гамма-опромінювачі. Кобальтовий гамма-опромінювач на даний момент є апаратом попереднього покоління у променевій терапії. У пацієнтів контрольної групи був більший відсоток таких ускладнень як: постпроменевий кардіосклероз, пневмофіброз, постпроменеві опіки, капсульна контрактура.

На наш погляд саме тому у віддалені терміни спостереження 3 – 5 років лімфостаз досліджуваної групи спостерігався у 4,1% , а в контрольній групі – у 31,0%. Таким чином, застосування лінійного прискорювача у променевій терапії хворих на РМЗ є методом вибору.

3.1.3 Результати вивчення цитотоксичної ефективності протипухлинних лікарських засобів у хворих досліджуваної та контрольної груп

Аналіз виживаності пухлинних клітин після використання протипухлинних препаратів із застосуванням МТТ тесту показав, що у групі дослідження найвищу цитотоксичну активність по відношенню до люмінального А раку мали доксорубіцин, адрибластин та карбоплатин, до люмінального В – карбоплатин та цисплатин. (табл.3.1.1.).

Таблиця 3.1.1

Чутливість пухлинних клітин хворих на РМЗ до дії хіміопрепаратів перед проведенням НПХТ за показником життєздатних клітин після культивування із хіміопрепаратом (%)

Молекулярний тип		Протипухлинні препарати								
		Енд	Док	Адр	Епі	Пак	Доц	Так	Кар	Цис
Люм А	N=20	30±11,2	18±4,2	13±2,9	35±9,1	32±7,6	42±13,3	34±12,2	18±4,4	38±10,3
Люм В	N=40	28±6,3	28±6,0	24±6,2	51±11,4	32±5,8	29±6,0	28±6,1	23±8,1	23±7,0

Примітка: Енд – ендоксан, Док – доксорубіцин, Адр – адрибластин, Епі – епірубіцин, Пак – паклітаксел, Доц – доцетаксел, Так – таксотер, Кар – карбоплатин, Цис – цисплатин

Визначення чутливості пухлинних клітин до ПХТ дозволило визначити максимально ефективні протипухлинні лікарські засоби по відношенню до тих чи інших молекулярних підтипів РМЗ у конкретної пацієнтки, що дозволило реалізувати принципи персоналізованої терапії і покращити результати комплексного лікування.

3.1.4. Порівняльна характеристика ускладнень після поліхіміотерапії у хворих досліджуваної та контрольної груп

В результаті поведеної НПХТ серед пацієнтів як контрольної (n=30) так і досліджуваної (n=30) групи були констатовані різні види ускладнень. Переважну більшість склали такі зі сторони ШКТ та крові (табл.3.1.2).

Таблиця 3.1.2

Ранні та пізні постхіміотерапевтичні ускладнення у хворих на РМЗ

Види ускладнень	Досліджувана група	Контрольна група
З боку крові (лейко-, еритро-, тромбоцитопенії	28	50
З боку ССС	7	13
Гнійно-септичні ускладнення (пневмонії, пієлонефрити, менінгіти тощо)	3	5
Ангіонейропатії кінцівок	21	38
З боку ШКТ (нудота, блювання, діарея)	45	60

У хворих досліджуваної групи під час курсів НПХТ в обов'язковому порядку встановлювались передопераційні мітки, так як внаслідок хіміотерапії пухлина могла значно зменшитись або зникнути. Після 2-4 курсу НПХТ пухлини не візуалізовувались інструментальними методами (КТ, ММГ, УЗД) та не визначались клінічно. Завдяки цьому методу стало можливим уникнення мастектомій та збільшення відсотку органзберігаючих операцій в досліджуваній групі.

Після проведення курсу НПХТ та оперативного втручання було проведено дослідження лікувального патоморфозу. Лікувальний патоморфоз післяопераційного матеріалу хворих досліджувальної групи (т.т яким проводили ХТ згідно з визначенням чутливості до хіміопрепаратів за рівнем

циркулюючих mi-RNA) мав вищі показники в порівнянні з контрольною групою, де ХТ проводилась без визначення чутливості до хіміопрепаратів.

Таблиця 3.1.3

Показники лікувального патоморфозу післяопераційного матеріалу в досліджуваних (n=30) та контрольній групі (n=30) пацієнток після курсів НПХТ

Ступінь патоморфозу	Групи хворих на РМЗ	
	Досліджувана, n/%	Контрольна, n/%
I	4/6,6	16/26,7
II	32/53,4	28/46,7
III	12/20,0	8/13,3
IV	12/20,0	8/13,3

Зокрема, найбільший відсоток склали хворі як контрольної так і досліджуваної групи, у яких було встановлено лікувальний патоморфоз 2 ступеню (46,7% та 53,4% відповідно). Достовірно частіше виявлено лікувальний патоморфоз 1 ступеню у хворих контрольної групи (26,7% vs 6,6% у хворих досліджуваної групи). Частка хворих, у яких констатовано лікувальний патоморфоз 3 та 4 ступеню серед хворих досліджуваної групи, загалом становила 40%, тоді як цей показник у контрольній групі складав лише 26,6%.

Дані дослідження свідчать, що пацієнтки досліджуваної групи, які отримували ХТ згідно з визначенням чутливості до хіміопрепаратів мали значно більші показники лікувального патоморфозу (стійкі типові зміни клінічних та морфологічних проявів пухлини під дією лікування - ХТ), ніж пацієнтки з контрольної групи, яким ХТ виконувалось загальними стандартизованими схемами, без визначення чутливості до хіміопрепаратів.

3.2. Віддалені результати лікування

Віддалені результати ефективності проведеного лікування оцінені нами за показниками трирічної та п'ятирічної загальної та безрецидивної виживаності.

Порівняння показників виживаності хворих на РМЗ в дослідній та контрольній групах (n=60) виявило статистично достовірну відмінність показників за критерієм Log-Rank Test лише для показника загальної виживаності (WW = -4,640 Sum = 19,724 Var = 4,9725 Test statistic = -2,08061 p = 0,03747), а для безрецидивної виживаності це значення було недостовірним (WW = -3,825 Sum = 45,956 Var = 11,586 Test statistic = -1,12381 p = 0,26110) (рис.3.1, 3.2).

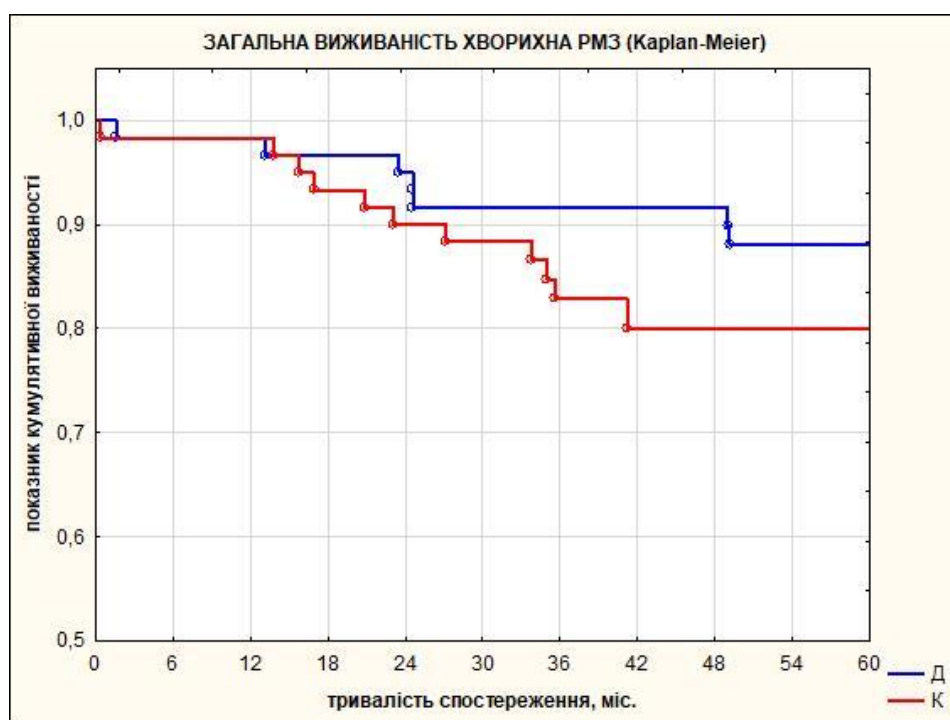


Рисунок. 3.1. Загальна виживаність хворих на РМЗ дослідній та контрольній групах.

Показники загальної 3-річної виживаності в досліджуваний та контрольній групах становлять $92,06 \pm 3,8\%$ та $82,3 \pm 5,0\%$ відповідно; 5-річна

виживаність – $88,2 \pm 5,0\%$ та $80,4 \pm 10,5\%$ відповідно. Різниця зазначених показників статистично достовірна, складає $9,7\%$ та $7,8\%$ відповідно ($p = 0,04$).

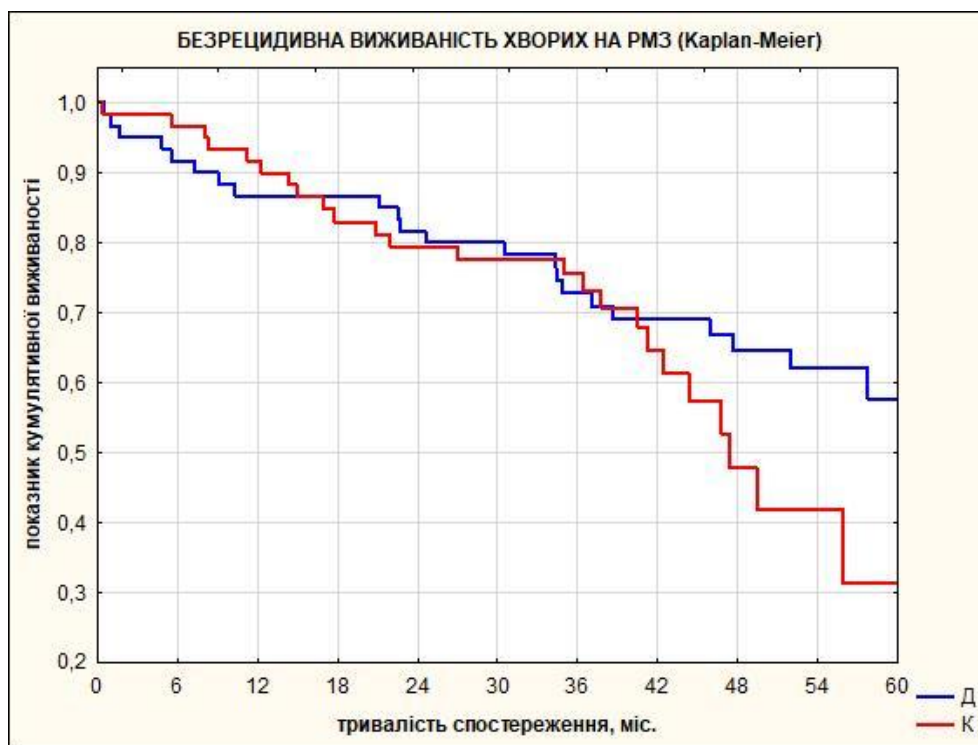


Рисунок. 3.2. Безрецидивна виживаність хворих на РМЗ дослідній та контрольній групах.

Показники безрецидивної 3-річної виживаності в досліджуваній та контрольній групах становлять $72,4 \pm 6,7\%$ та $76,5 \pm 8,4\%$ відповідно; 5-річна безрецидивна виживаність - $58,6 \pm 9,0\%$ та $31,7 \pm 9,5\%$ відповідно. Різниця статистично достовірна лише для показників 5-річної безрецидивної виживаності ($26,9\%$, $p = 0,03$).

Також нами проведено вивчення загальної та безрецидивної виживаності в досліджуваній групі залежно від молекулярного підтипу пухлини. Виявлено статистично достовірну різницю у значеннях показників загальної виживаності хворих на люмінальний А підтип пухлини порівняно з люмінальним В підтипом за Log-Rank Test ($WW = -1,313$ Sum = 6,8390 Var =

1,5050 Test statistic = -1,07048 $p = 0,28440$) в групах дослідження. Стосовно показників безрецидивної виживаності хворих не встановлено статистичної достовірності відмін (TestWW = 1,0265 Sum = 21,957 Var = 4,8317 Test statistic = 0,4669774 $p = 0,64052$) (див. рис. 3.3, 3.4).

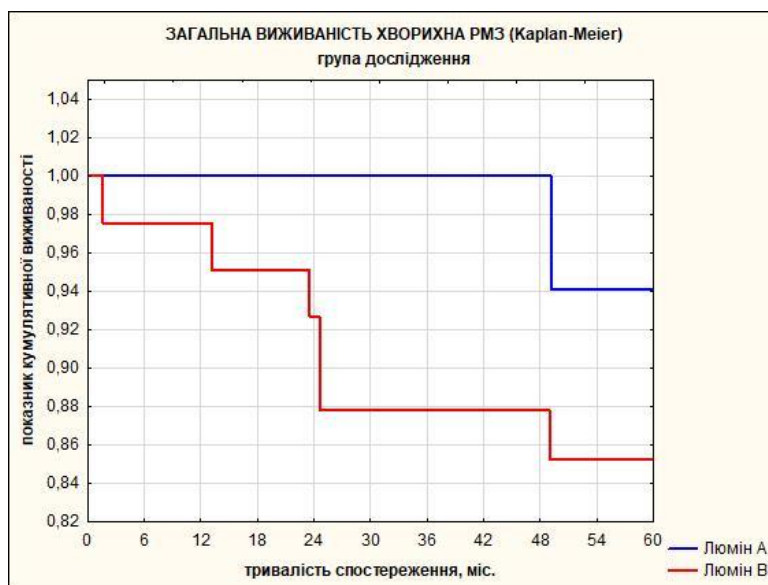


Рисунок. 3.3. Загальна виживаність хворих на РМЗ в групі дослідження з урахуванням молекулярного підтипу пухлини.

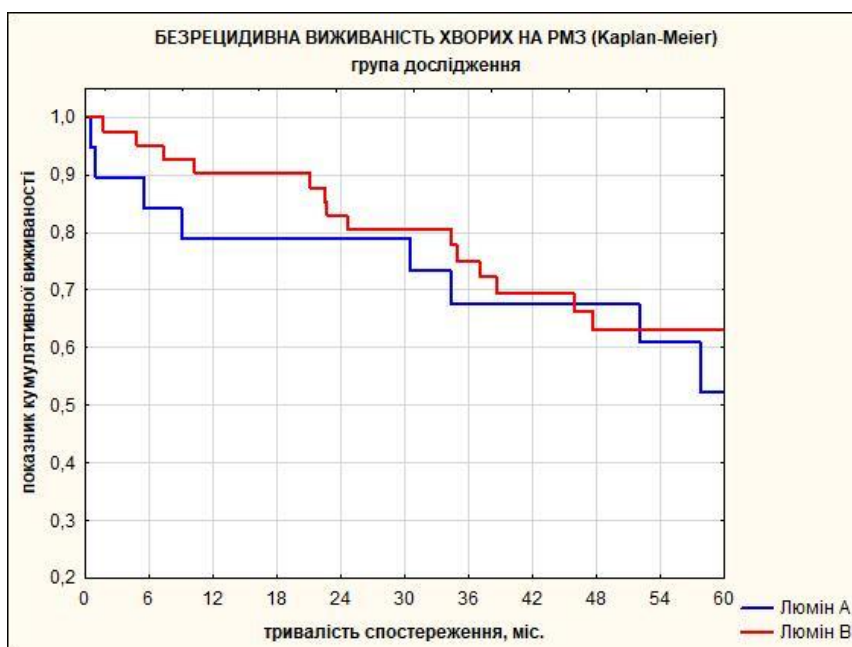


Рисунок 3.4. Безрецидивна виживаність хворих на РМЗ в групі дослідження з урахуванням молекулярного підтипу пухлини.

Таким чином, отримані дані дослідження переконливо демонструють достовірне підвищення показників безрецидивної та загальної 3 і 5 –річної виживаності хворих на РМЗ у групі пацієнток, яким ПХТ проводилася в неoad'ювантному режимі після визначення чутливості пухлинних клітин до протипухлинних лікарських засобів.

3.3.Результати моніторингу клінічного перебігу РМЗ у хворих на метастатичні ураження кісток

Враховуючи дані, отримані співробітниками відділу пухлинного процесу та дизайну терапії ІЕПОР ім.Р.С.Кавецького НАН України про динаміку змін експресії маркерів кісткової резорбції та остеогенезу [282], починаючи з 4 року спостереження нами при контрольних оглядах пролікованих в повному обсязі комплексного лікування проводилось визначення маркерів кісткового обміну особливо у пацієнток зі скаргами на появу болю в різних анатомічних зонах тіла. Завдяки цьому вдалося у 5 пацієнток контрольних груп запідозрити метастатичні ураження скелету. При цілеспрямованому обстеженні у цих хворих ділянки локалізації болю було визначено літичну деструкцію кістки. Показники маркерів кісткового обміну у них були підвищені, що відповідало їх концентраціям при метастатичному ураженні кісток.

Так, при аналізі результатів визначення СТХ в сироватці крові хворих з метастазами в кістки (див. табл. 3.1.4) виявлена підвищена концентрація показника в порівнянні з хворими на первинні злоякісні пухлини кісток, про що свідчать як медіани (0,92 і 0,41 нг / мл), так і середні рівні (1,12 і 0,43 нг / мл) показника остеолізу, причому виявлені відмінності були достовірні ($P = 0,000001$). При цьому для хворих аналізованих груп максимальні рівні СТХ істотно перевищували показник норми в 4,6 рази при метастатичному ураженніскелета.

Таблиця 3.3.4

Динаміка маркерів кісткової резорбції та остеогенезу у хворих на РМЗ з мтастатичним ураженням кісток до та після ендопротезування.

До операції	Післяопераційний період						
	10 доба	1міс	3 міс	6 міс	9 міс	Стійка ремісія	Метастазування
Маркер кісткової резорбції, СТХ, нг/мл, сироватка крові							
11.00±0.21/ 14.02±0.45	9.54±0.23/ 13.21±0.38	7.37±0.25/ 12.11±0.34	4.28±0.22/ 10.25±0.36	1.91±0.15/ 8.15±0.30	2.17±0.12/ 5.09±0.24	2.56±0.11/ 5.24±0.27	6.35±0.36/ 9.44±0.38
Маркер кісткової резорбції, ДПДД, нмоль/ммоль креатиніну, сеча							
8.80±0.32/ 11.94±0.38	7.50±0.29/ 11.00±0.35	7.10±0.31/ 10.80±0.33	5.35±0.29/ 8.89±0.29	4.28±0.26/ 7.51±0.24	4.49±0.52/ 6.74±0.25	4.89±0.41/ 6.85±0.27	7.49±0.38/ 9.83±0.35
Маркер кісткової резорбції, ТРКФ-б, Од/л, сироватка крові							
5.62±0.19/ 7.22±0.22	5.04±0.25/ 6.61±0.21	4.24±0.24/ 6.14±0.22	2.65±0.29/ 5.64±0.28	2.69±0.31/ 4.88±0.33	2.50±0.32/ 4.07±0.33	2.79±0.35/ 3.96±0.29	4.06±0.38/ 4.99±0.39
Маркер остеосинтезу, КЛФ, Од/л, сироватка крові							
48.80±4.70/ 79.22±5.23	39.71±5.23/ 72.01±6.65	28.46±5.05/ 58.16±6.95	15.04±3.24/ 49.43±6.13	14.32±3.53/ 31.33±3.07	15.41±3.70/ 30.52±4.33	17.21±4.06/ 29.00±4.24	41.77±5.32/ 49.66±6.31
Маркер остеосинтезу, остеокальцин, мкг/л, сироватка крові							
12.70±0.73/ 16.30±0.82	11.09±0.74/ 14.50±0.89	9.02±0.82/ 13.33±0.79	8.09±0.84/ 10.72±0.75	7.21±0.65/ 8.99±0.79	6.86±0.55/ 9.08±0.93	6.99±0.61/ 8.75±0.87	10.56±0.84/ 12.36±0.94

Примітка: чисельник – хворі на РМЗ без остеопорозу, знаменник - хворі на РМЗ з остеопорозом

Як видно з даних таблиці, у хворих при метастатичному ураженні максимальні рівні ДПД перевищували відповідний показник контрольної групи в 2,5 рази. Медіана ДПД у хворих на вторинні пухлинні ураження кісток у порівнянні з показником групи контролю та хворих на остеопороз в 1,2 рази підвищена, виявлені зміни показника були достовірними ($P = 0,002$ і $p = 0,01$ відповідно).

При аналізі результатів визначення активності ТРКФ-5b в сироватці крові хворих з метастатичними ураженнями кісток виявлено її збільшення в порівнянні з хворими на первинні злоякісні новоутворення кісток, про що свідчать медіани ТРКФ-5b (6,9 і 5,3 Од / л відповідно), виявлені відмінності були достовірними ($p = 0,014$).

Згідно з наведеними в таблиці даними, перед операцією кількість маркерів кісткової резорбції була достовірно ($p < 0,01$) підвищена порівняно з вихідним значенням. На 10-ту добу після операції спостерігалася тенденція до зниження маркерів кісткової резорбції та остеосинтезу.

При подальшому спостереженні за хворими виявлено підвищення маркерів кісткової резорбції та остеогенезу (для метастатичних пухлин: $СТХ > 0,72$ нг/мл, $ДПД > 8,5$ нмоль/моль креатиніну, $ТРКФ > 4,4$ Од/л, $КЛФ > 47$ Од/, $остеокальцину > 10,20$ мкг/л; для первинних злоякісних пухлин: $СТХ > 0,82$ нг/мл, $ДПД > 9,1$ нмоль/моль креатиніну, $ТРКФ > 5,1$ Од/л, $КЛФ > 54$ Од/л, $остеокальцину > 11,80$ мкг/л) вказує на прогресування захворювання і спостерігається за 3-6 місяців до клінічних/рентгенологічних проявів рецидиву та метастазів.

Пацієнткам з ураженням хребта застосували бісфосфонати, а пацієнткам з метастатичним ураженням довгих трубчастих кісток провели хірургічні втручання: резекції проксимальних та дистальних сегментів з заміщенням дефектів ендопротезами.

Показник трирічної загальної виживаності пролікованих хворих склав 46,3%, а якість життя оцінювали за даними шкал функціонального,

симптоматичного і загального стану здоров'я: EORTC QLQ-C30 і модулем EORTC QLQ-BM2.

За результатами анкетування показник «фізичного стану» пацієнток після ендопротезування підвищився до 58,7 бала (при вихідному показнику 24,3 бала), показник «емоційної сфери» збільшився з 40,5 до 63,3 балів, «пізнавальної функції» - з 62,1 до 78 балів. Підвищилися показники «соціальної активності» пацієнток з 19 до 58,9 балів. Змінилися дані «загального стану», що визначаються самими пацієнтками – з 21,9 до 38,6 балів. Отримані дані свідчать про суттєве поліпшення якості життя пролікованих пацієнток і є співставні з даними інших дослідників, які розробляють алгоритми моніторингу онкологічних пацієнтів, зокрема хворих на РМЗ [25, 104, 109].

Отже, вважаємо за необхідне включення в діагностично-лікувальний алгоритм у хворих на РМЗ обов'язкове визначення вмісту маркерів кісткового обміну в біологічних рідинах організму, так як підвищення їх концентрацій виявляється на 3-6 місяців раніше клінічної чи радіологічної маніфестації метастатичного ураження скелету.

Підсумок:

Застосування оптимізованого діагностично-лікувального алгоритму у хворих, яким лікування проводилося з урахуванням чутливості пухлини до ПХТ в неoad'ювантному режимі порівняно з хворими, яким проводилася ПХТ за стандартними протоколами, призвело до достовірного підвищення показників ефективності лікування хворих на РМЗ, про що свідчать показники загальної та безрецидивної виживаності. Встановлено, що загальна 3-річна виживаність в досліджуваній та контрольній групах становлять $92,06 \pm 3,8\%$ та $82,3 \pm 5,0\%$ відповідно, а 5-річна виживаність – $88,2 \pm 5,0\%$ та $80,4 \pm 10,5\%$ відповідно. Різниця зазначених показників статистично достовірна, складає 9,7% та 7,8% відповідно. Показники

безрецидивної 3-річної виживаності в досліджуваній та контрольній групах становлять $72,4 \pm 6,7\%$ та $76,5 \pm 8,4\%$ відповідно, а 5-річної безрецидивної виживаності - $58,6 \pm 9,0\%$ та $31,7 \pm 9,5\%$ відповідно. Різниця статистично достовірна лише для показників 5-річної безрецидивної виживаності ($26,9\%$, $p = 0,03$).

Матеріали досліджень, представлені у розділі 3, опубліковані у [272,282,284].

РОЗДІЛ 4

ПРОФІЛЬ ЕКСПРЕСІЇ міРНК У ЗДОРОВИХ ЖІНОК ТА ХВОРИХ НА РМЗ

4.1. Дослідження профілю експресії міРНК у здорових жінок

Досліджено рівень експресії циркулюючих у крові міРНК у 18 здорових жінок. Середній вік обстежених $36 \pm 2,4$ роки (min=21, max=55). Кількісна характеристика циркулюючих у плазмі крові міРНК наведено у таблиці 4.1. Відмічено, що рівень експресії міРНК характеризується високою дисперсією і тому оцінка показників може бути поєднана аналізом середніх значень показника і аналізом медіани з кватильним розподілом. Найбільший рівень серед 10-и досліджуваних міРНК був (по мірі зменшення): а) на основі середнього – міРНК-27, міРНК-335, міРНК-663; на основі медіани – міРНК-200, міРНК-139, міРНК-497.

Таблиця 4.1

Рівень експресії міРНК в плазмі крові здорових жінок

Тип міРНК	Статистичний показник (N копій $\times 10^3$)						
	Mean	SD	min	max	Me	Q1	Q3
міРНК-155	46,8	24,9	0,1	359,9	1,1	0,6	3,04
міРНК-205	395,8	310,8	0,04	5950,6	1,1	0,3	149,2
міРНК-200	73,4	33,3	0,2	602,5	13,8	2,2	57,8
міРНК-139	300,8	294,2	0,03	5597,5	2,3	1,6	7,4
міРНК-27	1459,4	1456,8	0,01	27681,9	0,9	0,4	3,09
міРНК-335	571,1	521,2	0,002	9933,6	1,3	0,6	9,3
міРНК-30	64,5	61,8	0,001	1177,0	0,6	0,9	4,6
міРНК-25	2,9	2,0	0,2	40,3	0,3	0,03	1,4
міРНК-497	4,4	1,3	0,06	19,3	2,1	0,4	4,8
міРНК-663	486,7	315,3	0,1	5950,6	0,9	0,3	204,9

Проведено кореляційний аналіз між парами міРНК і одержано наступні результати за ранговим критерієм кореляції Спірмена (табл. 4.2). Встановлено різний зв'язок між парами міРНК, що є відображенням їх експресії. Так, міРНК-205 мала істотний позитивний зв'язок з міРНК-25 та міРНК-663 та між ними (тріада взаємнопозитивного зв'язку).

Таблиця 4.2

**Кореляційні зв'язки між рівнями експресії міРНК у плазмі крові
здорових жінок**

n=18	міРНК-25	міРНК-27	міРНК-30	міРНК-139	міРНК-155	міРНК-200	міРНК-205	міРНК-335	міРНК-497	міРНК-663
міРНК-25	1,0									
міРНК-27	0,09 p=0,72	1,0								
міРНК-30	0,43 p=0,08	0,35 p=0,16	1,0							
міРНК-139	-0,25 p=0,32	0,24 p=0,33	0,18 p=0,46	1,0						
міРНК-155	0,02 p=0,95	-0,37 p=0,13	-0,10 p=0,68	-0,02 p=0,94	1,0					
міРНК-200	-0,38 p=0,12	-0,40 p=0,10	-0,53 p=0,02	0,40 p=0,10	0,18 p=0,48	1,0				
міРНК-205	0,69 p=0,00	0,27 p=0,29	0,28 p=0,26	-0,41 p=0,09	0,28 p=0,26	-0,52 p=0,03	1,0			
міРНК-335	0,35 p=0,15	0,20 p=0,43	0,28 p=0,27	-0,70 p=0,00	-0,33 p=0,19	-0,48 p=0,04	0,44 p=0,07	1,0		
міРНК-497	-0,06 p=0,82	0,33 p=0,18	0,20 p=0,42	-0,19 p=0,44	-0,14 p=0,59	-0,40 p=0,10	-0,01 p=0,98	0,40 p=0,10	1,0	
міРНК-663	0,51 p=0,03	0,33 p=0,18	0,30 p=0,22	0,07 p=0,78	-0,08 p=0,75	-0,13 p=0,61	0,61 p=0,01	0,29 p=0,25	0,05 p=0,84	1,0

Примітки: за шкалою Чеддока: 0,3 практично відсутні; 0,3-0,5 слабкий; 0,5-0,7 істотний; 0,7-0,9 сильний.

-1.0-0.7	-0.5-0.7	-0.3-0.5	-0.3-0	0-0,3	0.3-0.5	0.5-0.7	0.7-1.0
----------	----------	----------	--------	-------	---------	---------	---------

На противагу цьому встановлено слабкий зв'язок між експресією міРНК-200 та міРНК-335 та істотно позитивний з між міРНК-200 та міРНК-30, хоча між останньою парою міРНК не виявлено статистично значущого кореляційного зв'язку. Рівень експресії міРНК-200 характеризувався негативним зв'язком істотної сили з рівнем експресії міРНК-205. Також встановлено сильну негативну залежність між експресією міРНК-335 та міРНК-139. Між рівнем експресії міРНК-205 та міРНК-139 значення критерію кореляції Спірмена було оцінено як тенденцію до негативного

зв'язку ($r_s = -0,41$; $p = 0,09$). Тобто, при аналізі рівня експресії міРНК у плазмі крові здорових жінок встановлено три залежності, на які слід звернути увагу при дослідженні циркулюючих у плазмі міРНК – триада міРНК-200 vs міРНК-335 vs міРНК-30, триада міРНК-25 vs міРНК-663 vs міРНК-205, пара міРНК-335 vs міРНК-139. Ці міРНК можуть бути використані як показники змін профілю експресії міРНК за наявності різних факторів у дослідженні розвитку захворювання.

Враховуючи фактор віку, генеральну вибірку здорових жінок було кластеризовано за віком до 45 років та 45 років і старше (табл. 4.3). Проведено порівняльний аналіз рівня експресії міРНК у плазмі крові здорових жінок, силу та спрямованість зв'язку експресії між ними.

Таблиця 4.3

Рівень експресії міРНК у плазмі крові здорових жінок двох вікових категорій (Mean $\pm$ SD)

міРНК	Вік		р-значення за критерієм Манна-Уїтні
	до 45 років	45 років і старше	
міРНК-155	72 477,2 $\pm$ 37947,4	3 204,0 $\pm$ 2231,8	0,13
міРНК-205	617 417,3$\pm$487970,5	18 427,3$\pm$18267,6	0,01
міРНК-200	88 528,1 $\pm$ 50776,7	55 471,5 $\pm$ 31026,6	0,20
міРНК-139	474 297,5 $\pm$ 465765,9	4 213,7 $\pm$ 1236,9	0,26
міРНК-27	2 310 011,0 $\pm$ 2306539,9	1 477,3 $\pm$ 523,3	0,32
міРНК-335	895 321,9 $\pm$ 823379,1	17 929,8 $\pm$ 16686,7	0,29
міРНК-30	100 821,4 $\pm$ 97849,2	2 885,4 $\pm$ 16686,7	0,39
міРНК-25	1 237,2$\pm$339,6	6 755,5$\pm$6712,3	0,04
міРНК-497	3 004,6 $\pm$ 1235,3	7 844,0 $\pm$ 3213,7	0,09
міРНК-663	736352,4 $\pm$ 491749,1	68481,8 $\pm$ 43923,2	0,08

Результати статистичного аналізу за непараметричним критерієм Манна-Уїтні дозволили виявити міжгрупову різницю між двома віковими категоріями жінок. Так, у здорових жінок віком до 45 років рівень експресії міРНК-205 був достовірно більшим ($p = 0,01$), ніж у жінок віком 45 років і

старше. Разом з тим, встановлено більшим рівень експресії міРНК-25 у жінок старшого віку ($p=0,04$). Інші показники були у межах статистичної похибки. Проведено кореляційний аналіз взаємозалежності експресії міРНК. Виявлено спільні та відмінні залежності рівнів аналізованих міРНК. У таблицях 4.4 та 4.5 наведено результати статистичного аналізу за ранговим критерієм Спірмена.

Таблиця 4.4

**Кореляційні зв'язки між рівнями експресії міРНК у плазмі крові
здорових жінок вікової категорії до 45 років**

Rho (rs)	Тип міРНК									
	mi-155	mi-205	mi-200	mi-139	mi-27	mi-335	mi-30	mi-25	mi-497	mi-663
міРНК-155	1,0									
міРНК-205	0,45 $p=0,14$	1,0								
міРНК-200	0,16 $p=0,62$	-0,62 $p=0,03$	1,0							
міРНК-139	-0,10 $p=0,76$	-0,40 $p=0,20$	0,27 $p=0,39$	1,0						
міРНК-27	-0,55 $p=0,06$	0,15 $p=0,63$	-0,41 $p=0,19$	0,31 $p=0,33$	1,0					
міРНК-335	-0,21 $p=0,51$	0,52 $p=0,08$	-0,44 $p=0,15$	-0,72 $p=0,01$	0,12 $p=0,71$	1,0				
міРНК-30	0,11 $p=0,73$	0,33 $p=0,30$	-0,46 $p=0,13$	0,43 $p=0,17$	0,23 $p=0,47$	0,01 $p=0,97$	1,0			
міРНК-25	0,15 $p=0,635$	0,29 $p=0,35$	-0,19 $p=0,56$	-0,08 $p=0,81$	-0,10 $p=0,76$	0,08 $p=0,81$	0,35 $p=0,27$	1,0		
міРНК-497	-0,14 $p=0,66$	0,40 $p=0,20$	-0,36 $p=0,25$	-0,22 $p=0,50$	0,42 $p=0,17$	0,48 $p=0,11$	0,03 $p=0,91$	0,05 $p=0,88$	1,0	
міРНК-663	-0,03 $p=0,91$	0,40 $p=0,20$	-0,10 $p=0,75$	0,22 $p=0,48$	0,35 $p=0,27$	0,35 $p=0,27$	0,36 $p=0,25$	0,15 $p=0,65$	0,57 $p=0,05$	1,0

Примітки: за шкалою Чеддока: 0,3 практично відсутні; 0,3-0,5 слабкий; 0,5-0,7 істотний; 0,7-0,9 сильний.

-1.0-0.7	-0.5-0.7	-0.3-0.5	-0.3-0	0-0,3	0.3-0.5	0.5-0.7	0.7-1.0
----------	----------	----------	--------	-------	---------	---------	---------

У жінок віком до 45 років виявлено сильний кореляційний зв'язок між експресією міРНК-497 та міРНК-663, тоді як у здорових віком 45 років і старше ця залежність відсутня (у генеральній вибірці залежність також не виявлено). При цьому у жінок другої вікової групи виявлено негативний сильний зв'язок між експресією міРНК-200 та міРНК-497, позитивний сильний зв'язок між міРНК-335 та міРНК-30 і відсутність такого між міРНК-

200 та miРНК-205, хоча остання пара мала сильний негативний зв'язок у жінок віком до 45 років. Різниця цих зв'язків наведена у таблиці 4.6. Ці результати вказують на зв'язок рівня експресії досліджуваних miРНК з віком, а відмінність між віковими групами може бути використана як один із критеріїв оцінки чутливості пухлини до терапії.

Таблиця 4.5

**Кореляційні зв'язки між рівнями експресії miРНК у плазмі крові
здорових жінок вікової категорії 45 років і старше**

Rho (rs)	Тип miРНК									
	mi-155	mi-205	mi-200	mi-139	mi-27	mi-335	mi-30	mi-25	mi-497	mi-663
miРНК-155	1,0									
miРНК-205	-0,49 p=0,33	1,0								
miРНК-200	0,37 p=0,47	0,14 p=0,79	1,0							
miРНК-139	0,26 p=0,62	0,26 p=0,62	0,77 p=0,07	1,0						
miРНК-27	-0,49 p=0,33	0,43 p=0,40	-0,43 p=0,40	0,20 p=0,70	1,0					
miРНК-335	-0,83 p=0,04	0,20 p=0,70	-0,66 p=0,16	-0,26 p=0,62	0,77 p=0,07	1,0				
miРНК-30	-0,83 p=0,04	0,20 p=0,70	-0,66 p=0,16	-0,26 p=0,62	0,77 p=0,07	1,0 p=0,00	1,0			
miРНК-25	-0,54 p=0,27	0,94 p=0,00	0,09 p=0,87	0,14 p=0,79	0,37 p=0,47	0,26 p=0,62	0,26 p=0,62	1,0		
miРНК-497	-0,26 p=0,62	-0,09 p=0,87	-0,94 p=0,00	-0,66 p=0,16	0,49 p=0,33	0,60 p=0,21	0,60 p=0,21	0,03 p=0,96	1,0	
miРНК-663	-0,49 p=0,33	1,0 p=0,00	0,14 p=0,79	0,26 p=0,62	0,43 p=0,40	0,20 p=0,70	0,20 p=0,70	0,94 p=0,00	-0,09 p=0,87	1,0

Примітки: за шкалою Чеддока: 0,3 практично відсутні; 0,3-0,5 слабкий; 0,5-0,7 істотний; 0,7-0,9 сильний.

-1.0-0.7	-0.5-0.7	-0.3-0.5	-0.3-0	0-0,3	0.3-0.5	0.5-0.7	0.7-1.0
----------	----------	----------	--------	-------	---------	---------	---------

Таким чином, у здорових жінок встановлено достовірний зв'язок між рівнем експресії деяких miРНК у плазмі крові:

- позитивний між: miРНК-205 з miРНК-25 і miРНК-663, miРНК-25 і miРНК-663;
- негативний між: miРНК-200 з miРНК-30 і miРНК-335, miРНК-205 і miРНК-200, miРНК-335 і miРНК-139.

Встановлено зв'язок між рівнем експресії міРНК-205 і міРНК-25 у здорових жінок в залежності від віку. Рівень міРНК у жінок до 45 років та старше 45 років відрізнявся. За результатами аналізу 10-и міРНК мала місце тенденція до зменшення рівня експресії восьми із десяти міРНК, а рівень експресії міРНК-205 у жінок 45 років і старше був достовірно меншим, ніж у жінок віком до 45 років. Тенденція щодо зростання рівня експресії міРНК відмічена для міРНК-497, тоді як рівень експресії міРНК-25 був достовірно більшим.

Таблиця 4.6

Характеристика кореляційних зв'язків у парах міРНК здорових жінок у генеральній вибірці дослідження та з урахуванням фактору віку

Пара міРНК	Напрямок зв'язку	Генеральна вибірка	Вік	
			до 45 років	45 років і старше
200 vs 205	негативний	+	+	—
200 vs 335	негативний	+	—	—
200 vs 30	негативний	+	—	—
200 vs 497	негативний	—	—	+
335 vs 139	негативний	+	+	+
335 vs 30	позитивний	—	—	+
205 vs 663	позитивний	+	—	+
205 vs 25	позитивний	+	—	+
663 vs 25	позитивний	+	—	+
663 vs 497	позитивний	—	+	—

Примітка: + виявлена статистично значуща залежність; — залежність відсутня

У жінок віком 45 років і старше встановлено зміну залежності експресії між деякими міРНК: мала місце негативна залежність між міРНК-155 і міРНК-335 і міРНК-30, міРНК-200 з міРНК-497. Аналіз зв'язку міРНК у здорових жінок свідчить про перспективність подальшого вивчення ролі

міРНК у розвитку РМЗ і привертають увагу, перш за все, міРНК-497, міРНК-30, міРНК-663, міРНК-335, міРНК-155.

4.2. Дослідження рівня експресії міРНК у плазмі крові хворих на РМЗ з урахуванням віку та тактики лікування

В результаті аналізу рівня експресії міРНК у здорових жінок та хворих на РМЗ нами не виявлено статистично значущої різниці у рівнях кожної з 10-ти міРНК (табл. 4.7). Разом з тим, врахування фактору віку показало деякі залежності і різницю між групами.

У здорових жінок виявлено наступні залежності: рівень експресії 9-ти з 10-им міРНК у плазмі крові мав тенденцію до зменшення у жінок вікової категорії 45 років і старше, а рівень міРНК-205 достовірно був більшим у жінок до 45 років і тільки рівень експресії міРНК-25 зростав з віком.

У жінок хворих на РМЗ виявлено дещо інші тенденції: достовірно зростав рівень експресії міРНК-27, -205, -335 і -663 у віковій категорії 45 років і старше, тенденцію до росту відмічено щодо міРНК-139, -155, -200 і -663. При цьому рівень міРНК-335 у хворих жінок до 45 років був істотно більшим порівняно із здоровими жінками, а міРНК-663 навпаки у хворих старшого віку. Ми зробили спробу виявити залежність між рівнем міРНК, тактикою лікування та фактором віку (табл. 4.8).

Таблиця 4.7

**Середній рівень експресії міРНК у плазмі крові здорових та хворих
на РМЗ з урахуванням віку (Mean/SEM×10³)**

Тип міРНК	Здорові (n=18)			Хворі (n=72)		
	до 45 років (n=12)	45 років і старше (n=6)	всього (n=18)	до 45 років (n=25)	45 років і старше (n=45)	всього (n=72)
міРНК-25	1,2/ 0,3	6,7/ 6,7*	3,0/ 2,2	11,0/ 4,3	35,2/ 22,9	26,2/ 14,4
міРНК-27	2310,0/ 2306,5	1,4 /0,5	1540,0/ 1537,7	105,1/ 72,3**	321,5/ 298,3*	237,5/ 187,7
міРНК-30	100,8/ 97,8	2,8 /2,3	68,1/ 65,2	233,0/ 136,5	41,4/ 17,0	113,3/ 52,8
міРНК-139	474,2/ 465,7	4,2/ 1,2	317,6/ 310,5	30,9/ 11,6	93,1/ 33,3	69,7/ 21,5
міРНК-155	72,4/ 37,9	3,2/ 2,2	49,3/ 26,1	33,3/ 22,0	62,2/ 35,8	51,3/ 23,8
міРНК-200	88,5/ 50,7	55,4/ 31,0	77,5/ 34,9	172,6/ 56,9	311,9/ 169,7	259,6/ 108,0
міРНК-205	617,4/ 487,9*	18,4/ 18,2*	417,7/ 327,7	325,1/ 172,3	273,1/ 141,3**	292,6/ 108,7
міРНК-335	895,3/ 823,3	17,9/ 16,6	602,8/ 550,0	10899,0/ 10814,0**	233,0/ 136,5*	6937,3/ 6757,6
міРНК-497	3,0/ 1,2	7,8/ 3,2	4,6/ 1,4	112,0/ 52,1**	44,8/ 24,3	70,0/ 24,8
міРНК-663	736,3/ 491,7	68,4/ 43,9	513,7/ 332,1	136,8/ 54,6	1617,6/ 1011,5**	1062,3/ 635,6

Примітки: * P<0,05 щодо категорії жінок віком до 45 років за критерієм

Таблиця 4.8

**Середній рівень експресії міРНК у плазмі крові хворих на РМЗ з
урахуванням віку та тактики лікування (Mean/SEM $\times 10^3$)**

Тип міРНК	Здорові (n=18)		Схема лікування (n=60)			
			АПХТ		НПХТ	
	до 45 років (n=12)	45 років і старше (n=6)	до 45 років (n=9)	45 років і старше (n=21)	до 45 років (n=11)	45 років і старше (n=19)
міРНК-25	1,2/0,3	6,7/6,7*	1,6 1,4	3,0/ 3,5	17,4/ 28,1	49,8/ 184,5
міРНК-27	2310,0/ 2306,5	1,4/ 0,5	196,4/581,0**	959,9/3588,4*	53,8/145,7**	33,2/ 133,6
міРНК-30	100,8 /97,8	2,8/ 2,3	396,3/ 1128,3	12,6/ 30,0	167,0/ 409,3	54,4/ 134,7
міРНК-139	474,2/ 465,7	4,2/ 1,2	16,8/ 43,1	12,9/ 20,8	41,8/ 70,8	129,3/ 262,8
міРНК-155	72,4/ 37,9	3,2/ 2,2	1,0/ 0,6	50,6/ 101,0	36,7/ 131,2	67,4/ 283,1
міРНК-200	88,5/ 50,7	55,4/ 31,0	45,7/ 75,1	128,9/ 288,5	265,4/ 355,0	394,5/ 1357,3
міРНК-205	617,4/487,9	18,4/18,2*	226,7/ 679,7	58,5/ 100,1†	386,6/ 1062,7	370,0/1132,6**
міРНК-335	895,3/ 823,3	17,9/ 16,6	577,1/ 1136,3	121,0/ 377,3	145,2/ 369,5	15766,4/ 87404,0
міРНК-497	3,0/ 1,2	7,8/ 3,2	11,3/19,2**	34,9/116,0*	176,7/340,3**	49,2/182,2*
міРНК-663	736,3/ 491,7	68,4/ 43,9	174,8/ 309,6	107,9/ 201,2	132,1/ 292,0	2299,5/ 8122,6†

Примітки: * P<0,05 щодо категорії жінок віком до 45 років за критерієм

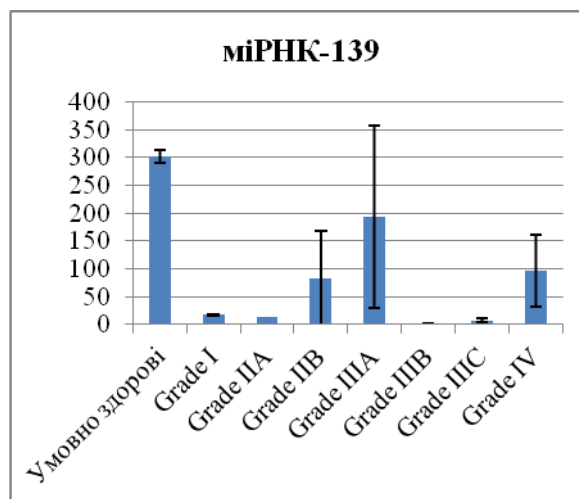
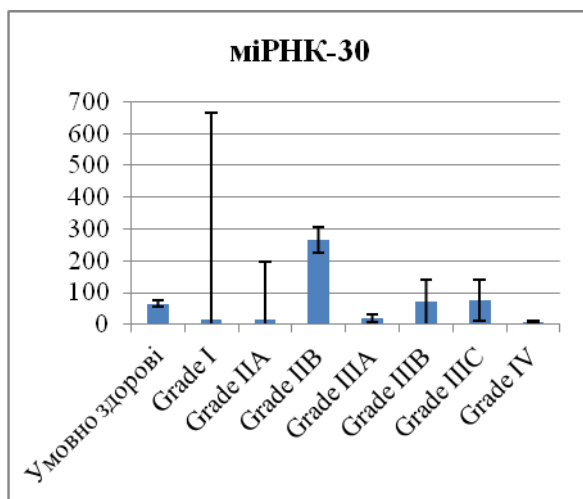
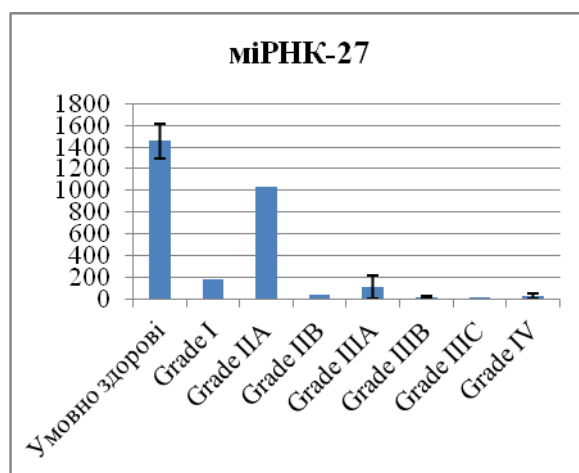
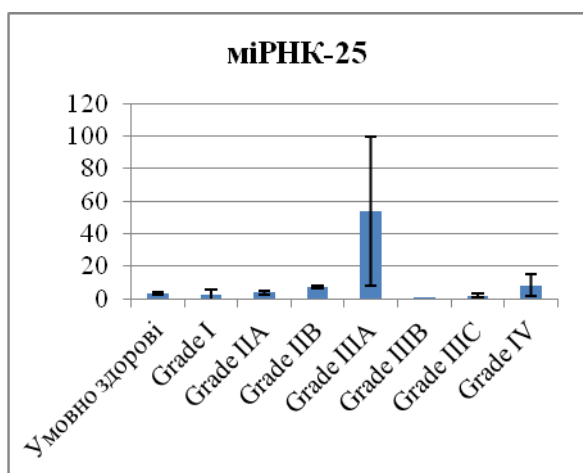
Манна-Уїтні; ** P<0,05 щодо здорових жінок за критерієм Манна-Уїтні;

† P=0,06 щодо категорії жінок контрольної групи за критерієм Манна-Уїтні

Рівень міРНК-497 був більшим порівняно із контрольною групою у хворих віком до 45 років у загальній вибірці спостережень. Після розподілу на підгрупи з урахуванням фактору терапії встановлено достовірно більший рівень експресії міРНК-497 у підгрупах з АПХТ та НПХТ обох вікових категорій хворих.

4.3. Рівень експресії міРНК залежно від стадії РМЗ

Проведено аналіз рівня експресії 10-ти міРНК у плазмі крові хворих на РМЗ з урахуванням стадії захворювання (Grade) (Рис. 4.1). Як видно з графіків можна відмітити деякі залежності. Наприклад, порівняно із здоровими жінками у хворих на РМЗ має місце тенденція до зростання рівня експресії міРНК-497 при IIIA-IV стадії і міРНК-200 при IV стадії, та зменшення рівня експресії міРНК-27 при IIB-IV стадії.



Продовження рис.4.1

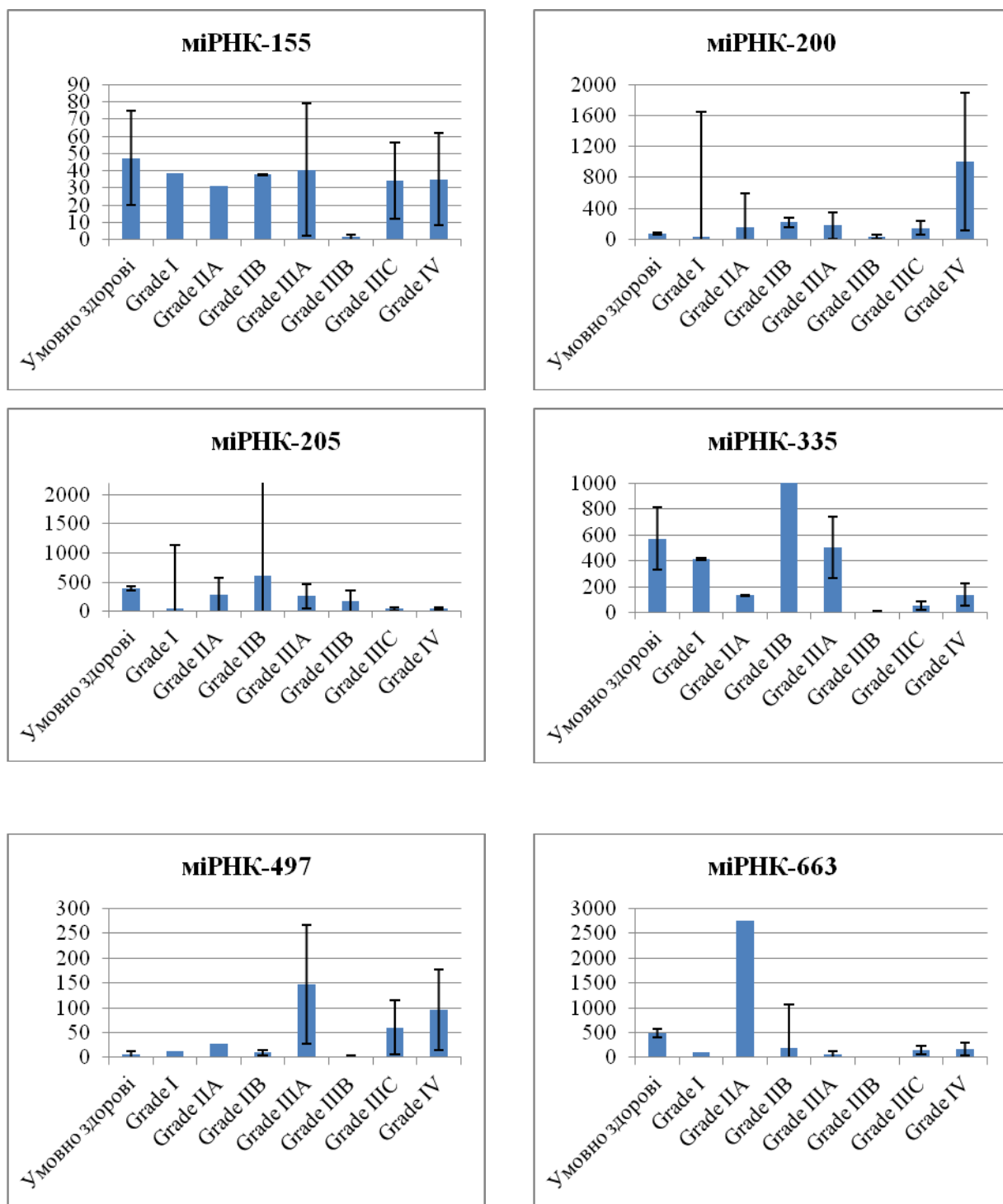


Рисунок 4.1. Рівень експресії міРНК з урахуванням стадії РМЗ (Mean×10³).

Виявлені тенденції для деяких стадії захворювання не мали достовірної різниці щодо відповідних категорій у хворих групи контролю.

4.4. Кореляція між рівнем експресії міРНК у здорових жінок та хворих на РМЗ

Враховуючи виявлену різницю рівня експресії міРНК-27 та міРНК-497 у плазмі крові здорових та хворих на РМЗ і деякі залежності від віку хворих було проведено аналіз кореляції між досліджуваними 10-тьма міРНК (табл.4.9).

Таблиця 4.9

Кореляція між рівнем експресії міРНК у хворих на РМЗ (n=66)

n=66	міРНК-25	міРНК-27	міРНК-30	міРНК-139	міРНК-155	міРНК-200	міРНК-205	міРНК-335	міРНК-497	міРНК-663
міРНК-25	1,0									
міРНК-27	0,32	1,0								
міРНК-30	0,31	0,40	1,0							
міРНК-139	0,07	0,31	0,16	1,0						
міРНК-155	0,30	0,08	0,24	0,2	1,0					
міРНК-200	-0,19	0,13	-0,26	0,35	-0,01	1,0				
міРНК-205	0,39	0,32	0,65	-0,03	0,60	-0,39	1,0			
міРНК-335	0,36	0,20	0,19	0,16	0,10	-0,03	0,06	1,0		
міРНК-497	0,49	0,22	0,20	0,31	0,24	-0,02	0,20	0,43	1,0	
міРНК-663	0,34	0,21	0,45	0,17	0,39	-0,23	0,50	0,07	0,31	1,0

Примітка: за шкалою Чеддока: 0,3 практично відсутні; 0,3-0,5 слабкий; 0,5-0,7 істотний; 0,7-0,9 сильний.

У здорових жінок були встановлені кореляції між деякими показниками і тому ми їх виділили у кластери:

Кластер I: позитивна кореляція між експресією міРНК-25 та міРНК-205, міРНК-25 та міРНК-663, міРНК-205 та міРНК-663 (Рис. 4.2);

Кластер II: негативна кореляція між експресією міРНК-335 та міРНК-139, міРНК-335 та міРНК-200, міРНК-200 та міРНК-205, міРНК-200 та міРНК-30.

У хворих на РМЗ Кластер I був подібним і кореляційні зв'язки між зазначеними міРНК були позитивними. Проте Кластер II змінився: був відсутнім зв'язок між рівнем експресії міРНК-335 та міРНК-139, міРНК-335

та міРНК-200. Окрім того, нами були виявлені інші достовірні зв'язки між парами міРНК:

- 1) додатково з Кластером І мали позитивну кореляцію ще 6-ть міРНК;
- 2) виявлено кореляцію між експресією міРНК-205 та міРНК-27 і міРНК-155;
- 3) встановлено кореляцію між експресією міРНК-25 та міРНК-30, міРНК-139, міРНК-335, міРНК-155, міРНК-497, міРНК-27;
- 4) виявлено позитивні зв'язки між експресією міРНК-30 та міРНК-155, міРНК-205;
- 5) виявлено позитивні зв'язки між експресією міРНК-497 та міРНК-155, міРНК-497;
- 6) виявлено позитивні зв'язки між експресією міРНК-155 та міРНК-497, міРНК-663;
- 7) виявлено втрату негативної зв'язку між експресією міРНК-139 та міРНК-335, міРНК-30 і міРНК-200.

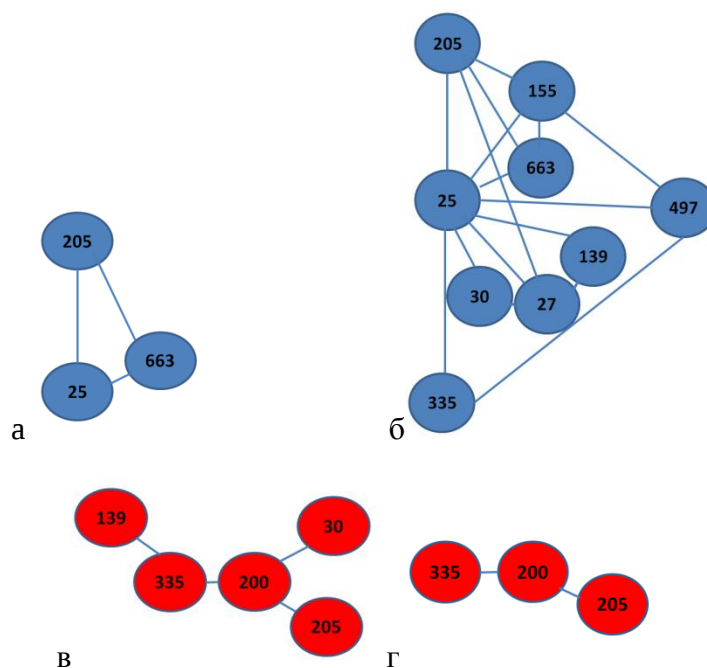


Рисунок 4.2. Кластери міРНК, виділені у групі здорових жінок та у хворих на РМЗ на основі кореляційного аналізу: позитивні кореляції у здорових (а) та хворих (б), негативні кореляції у здорових (в) та хворих (г).

На основі цих залежностей можна розглядати гіпотезу виникнення онкопроцесу як наслідок втрати негативного зв'язку між експресією міРНК-335 та міРНК-139 і міРНК-200, а натомість появу множинної позитивної залежності експресії між іншими міРНК, як, наприклад, це було показано для міРНК-25, міРНК-27 і міРНК497. Зміни рівня експресії у плазмі крові цих 3-х міРНК було представлено у таблиці 4.1 і 4.2. Тобто, міРНК-25, міРНК-27, міРНК497 і можливо міРНК-205 (як суміжна з ними у кореляційних зв'язках) потенційно можуть бути залучені у розвиток РМЗ.

4.5. Рівень експресії міРНК у хворих на РМЗ з урахуванням молекулярного типу пухлини

З метою виявлення ймовірних відмінностей в експресії міРНК у хворих на РМЗ було проведено аналіз досліджуваних маркерів у хворих з чотирма молекулярними типами РМЗ та здійснено порівняння із такими у здорових осіб. Результати середніх значень показників у таблиці 4.10.

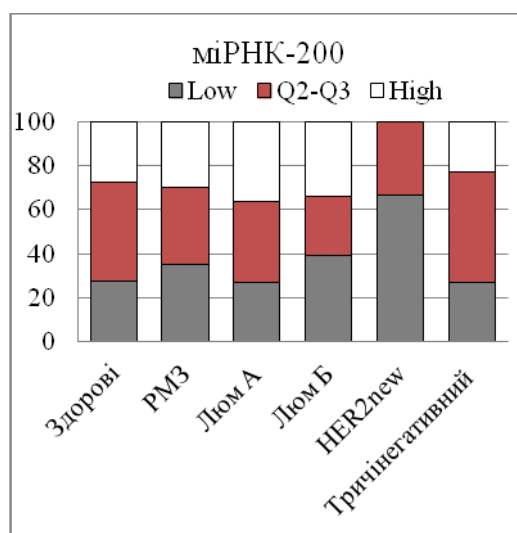
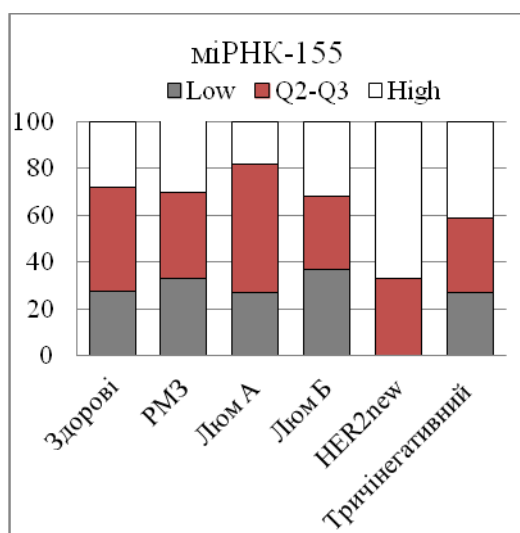
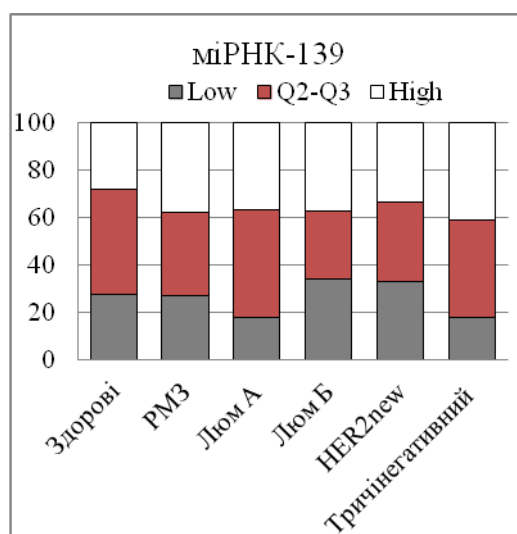
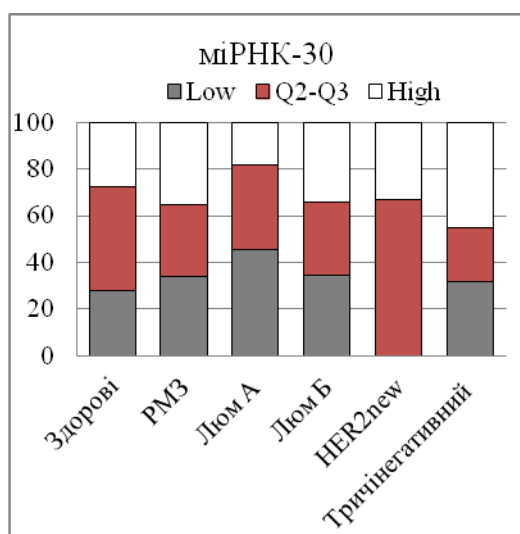
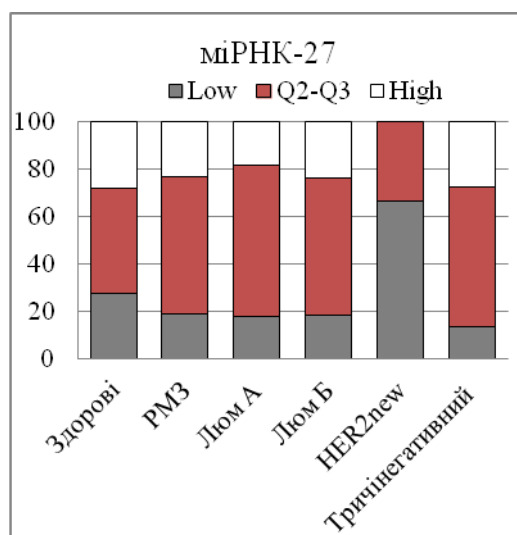
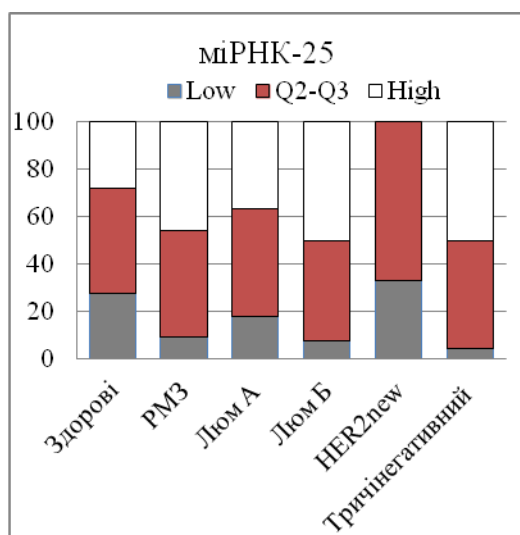
Ми не виявили достовірної різниці між групами за жодною з 10-ти міРНК. Відмічено тенденцію до збільшення рівня експресії міРНК-335 у хворих із люмінальним А типом РМЗ (щодо здорових осіб за критерієм Манна-Уїтні $p=0,29$, апостеріальний критерій Фішер LSD $p=0,02$).

На рисунку 4.3 наведено графіки розподілу хворих (емпірична частота) залежно від рівня експресії досліджуваних показників.

Таблиця 4.10

**Рівень міРНК у плазмі крові здорових жінок та хворих на РМЗ з
урахуванням молекулярного типу ($\text{Mean} \pm \text{SEM} \times 10^3$)**

Тип міРНК	Здорові	РМЗ			
		Люмінальний А	Люмінальний Б	HER2/neu	Тричі негативний
міРНК-25	3,0/	2,4/	15,0/	0,5/	10,1/
	2,2	0,9	9,0	0,3	4,9
міРНК-27	1540,0/	1221,9/	857,6/	1,1/	39,5/
	1537,7	1220,5	788,7	0,7	26,7
міРНК-30	68,1/	310,1/	45,5/	47,5/	105,0/
	65,2	309,2	21,5	46,8	71,3
міРНК- 139	317,6/	43,3/	54,4/	8,7/	56,9/
	310,5	32,3	31,2	6,9	25,8
міРНК- 155	49,3/	28,9/	19,0/	140,8/	37,8/
	26,1	27,3	9,1	109,8	24,5
міРНК- 200	77,5/	175,0/	387,1/	5,2/	123,4/
	34,9	102,7	199,8	4,1	48,1
міРНК- 205	417,7/	206,8/	600,8/	167,6/	437,2/
	327,7	186,3	404,6	101,9	279,1
міРНК- 335	602,8/	44312,1/	447,2/	0,6/	76,6/
	550,0	44240,1	199,2	0,2	63,8
міРНК- 497	4,6/	19,3/	49,0/	0,06/	86,9/
	1,4	14,7	24,9	0,03	53,3
міРНК- 663	513,7/	9,8/	1058,2/	92,5/	255,1/
	332,1	4,3	930,4	86,7	126,0



Продовження рис. 4.3

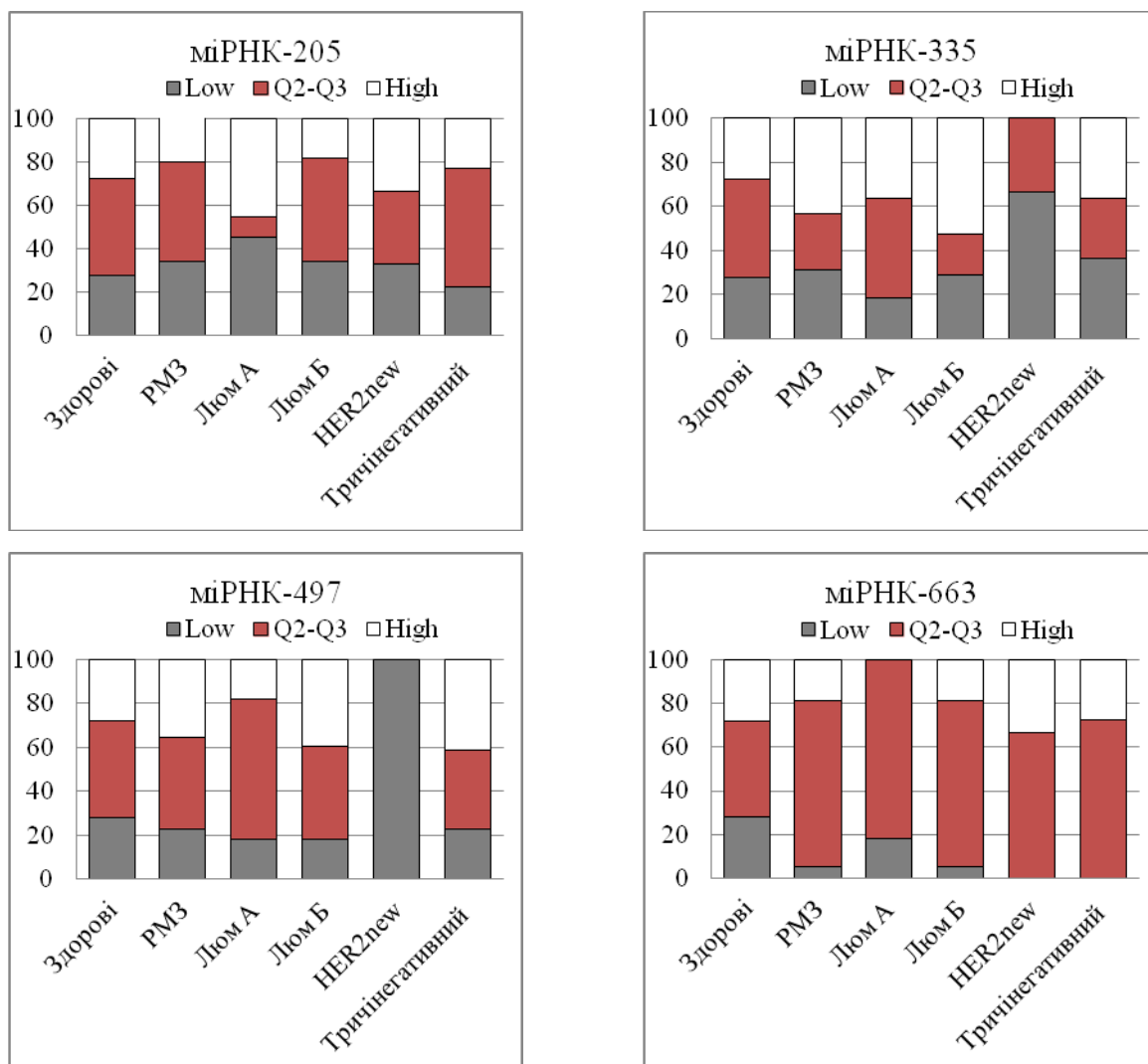


Рисунок 4.3. Розподіл частоти низької та високої експресії міРНК у здорових жінок і хворих на РМЗ. Точкою розподілу на низьку та високу експресію обрано здорових осіб як контролю: у лівих графіках медіану (Q1-Q2=Low; Q3-Q4=High), у правих графіках 2-й і 3-й квартилі (Q1=Low; Q2-Q3=Middle; Q4=High).

Зважаючи на те, що зміни рівня експресії міРНК у хворих на РМЗ базувався на аналізі характеристики рівнів 10-ти міРНК у здорових осіб, то медіану і середній квартильний розподіл було обрано за емпіричну точку

відліку. Зробивши за таким алгоритмом розрахунки частоти розподілу здорових осіб і хворих на РМЗ були виявлені деякі закономірності.

Встановлено більшу кількість хворих, у яких рівень експресії міРНК-25 було оцінено як високий порівняно щодо контролю і зменшення кількості осіб з низьким рівнем експресії міРНК-25. Частота розподілу хворих на РМЗ характеризувалась зміщенням показника експресії міРНК-27 у бік середніх значень, тобто тенденцію до зменшення високоекспресуючих випадків, що співпадає з концепцією зменшення експресії міРНК-27 у хворих жінок віком до 45 років. Показник рівня експресії міРНК-497 виявився неоднозначним, оскільки мав тенденцію до збільшення частки хворих із середнім її рівнем, хоча достовірно збільшився загальний рівень і мав тенденцію до росту у хворих з ІІІА-ІV стадією.

Слід звернути увагу на результати аналізу експресії міРНК-663: частота виявлення хворих з низьким рівнем експресії наближалась до «0», а якщо за критерій розподілу брати медіану варіаційного ряду, то частота виявлення зміщується у бік домінування випадків з високою експресією. Узагальнюючі результати аналізу цих 4-х міРНК наведено у таблиці 4.11.

Таблиця 4.11

Виникнення залежностей у найбільш значущих міРНК у хворих на РМЗ

Тип міРНК	Показник залежності		
	Зв'язок серед хворих на РМЗ	Зв'язок зі стадією РМЗ	Зв'язок з іншими міРНК у хворих
міРНК-25	Збільшення випадків з високим рівнем	Високі показники у хворих з ІІІА стадією	Множинні позитивні кореляції, міРНК-155, -497, -139, -27, -30, -335
міРНК-27	Тенденція до зменшення у хворих до 45 років	Зменшення рівня у хворих з І-ІV, крім ІА	Виникнення позитивних кореляцій з міРНК-30, -139, -25, -205
міРНК-497	Достовірно зростає у хворих	Тенденція до збільшення у хворих з ІІІА-ІV стадією	Виникнення позитивних кореляцій з міРНК-155, -25, -335
міРНК-663	Зростає достовірно у хворих 45 років і старше	Тенденція до збільшення у хворих з ІА стадією	Виникнення позитивної кореляції з міРНК-155

4.6. Оцінка рівня експресії міРНК у хворих на РМЗ після курсу НПХТ

Проведено оцінку динаміки змін рівня експресії міРНК після курсів НПХТ як показника ефективності або чутливості до хіміотерапії. Повторні дослідження рівнів експресії міРНК було досліджено у 18 з 47 пацієнтів. У таблиці 4.12 наведено результати першого та другого вимірювання, статистичну різницю розраховано на основі непараметричного критерію Уїлкоксона. Виявлено статистично значуще зменшення рівня експресії міРНК-25 після НПХТ (за критерієм Уїлкоксона, $Z = -2,20$, $P = 0,03$) з середнім розміром ефекту (за критерієм Коена $r = 0,36$ і тенденцію до зменшення рівня експресії міРНК-335 (за критерієм Фішера LSD) ($P < 0,05$).

Показник рівня експресії міРНК-25 і міРНК-335 були вищими до лікування порівняно з показником у здорових осіб (тенденція або достовірно відмінні). У 7 із 18 хворих виявлено метастази (у 5 з люмінальним Б і у 2 з тричі негативним РМЗ), у одного констатовано смерть, двоє хворих мали негативну динаміку, у одного був рецидив, у 14 встановлено стабілізацію процесу.

Таблиця 4.12

Рівень експресії міРНК у хворих на РМЗ після НПХТ (Mean/SEM $\times 10^3$)

Тип міРНК	Здорові (n=18)	Хворі на РМЗ	
		Дослідження I (n=18)	Дослідження II (n=18)
міРНК-25	3,0/2,2	61,1/54,5	1,6/0,4*
міРНК-27	1540,0/1537,7	12,7/7,1	3083,6/2121,0
міРНК-30	68,1/65,2	168,0/93,4	6,9/2,7
міРНК-139	317,6/310,5	120,0/50,3	46,7/21,9
міРНК-155	49,3/26,1	94,3/86,7	21,5/12,6
міРНК-200	77,5/34,9	239,1/144,0	243,1/162,6
міРНК-205	417,7/327,7	390,3/235,1	965,5/825,5
міРНК-335	602,8/550,0	27123,3/27034,6	466,4/385,1†

<i>Продовження табл.4.12</i>			
міРНК-497	4,6/1,4	79,6/55,8	35,0/23,8
міРНК-663	513,7/332,1	177,2/116,1	34,2/16,0

* $P < 0,05$ до дослідження I за критерієм Уїлкоксона

† $P < 0,05$ до дослідження I за критерієм Фішера LSD

Таким чином, на основі аналізу середнього рівня експресії 10-ти міРНК, частоти розподілу хворих за рівнем експресії міРНК, кореляційних зв'язків можна зробити висновок про те, що міРНК-25, міРНК-27, міРНК-335, міРНК-497 і міРНК-663 є перспективними щодо вивчення їх ролі у розвитку РМЗ та оцінки як потенційних показників ефективності або чутливості до лікування. За такого підходу міРНК-25 є найбільш перспективною з 10-ти, оскільки має тенденцію до зростання експресії у хворих, особливо при стадії ІІІА, у категорії хворих, які одержували НПХТ і виявились чутливими до НПХТ. міРНК-25 характеризується виникненням множинних позитивних кореляцій з іншими міРНК і її експресія не залежить від віку пацієнтки.

4.7. Кореляція між експресією міРНК та основними імуногістохімічними характеристиками пухлин різних молекулярних типів

Проведено порівняльний аналіз кількісної характеристики проліферативної активності пухлин молочної залози за результатами імуногістохімічного виявлення Ki-67 з урахуванням морфологічного типу пухлини. Протоковий інфільтраційний рак склав основну кількість спостережень у досліджуваній вибірці хворих – 62 (88,6%), а інші 8 (11,4%) – меділярні, папілярні, лобулярні карциноми, аденокарцинома. Різниця проліферативного індексу між двома групами порівняння не виявлено ($42,0 \pm 2,3\%$ vs $41,0 \pm 6,8\%$, $P = 0,16$).

Аналіз кореляційних зв'язків між рівнем експресії міРНК та деякими імуногістохімічними показниками пухлин (ER, PR, HER-2neu, Ki-67) виявив деякі достовірні зв'язки. Кореляційний аналіз за непараметричним критерієм Спірмена проведено з урахуванням молекулярного типу пухлин (табл. 4.14, 4.15, 4.16). Так, у групі хворих на РМЗ люмінального А типу встановлено істотну позитивну кореляцію між показником PR та рівнем експресії міРНК-30, тоді як у групах з люмінальним Б та тричі негативним типом подібної залежності не виявлено. Мала місце тільки тенденція до позитивного зв'язку між експресією PR (min=0, max=90%) і міРНК-200 ($Rho=0,35$, $p=0,05$) у хворих з люмінальним Б типом РМЗ. Достовірного зв'язку між експресією ER та рівнем експресії досліджуваних міРНК не було виявлено у хворих з люмінальним А та люмінальним Б типах пухлин.

Таблиця 4.14

Кореляція між рівнем експресії міРНК та деякими імуногістохімічними характеристиками пухлин хворих на люмінальний А РМЗ (n=12)

міРНК	Імуногістохімічні показники пухлин (%)			
	ER ⁺	PR ⁺	HER2-neu ⁺	Ki-67, %
міРНК-25	0,00 p=1,0	0,08 p=0,81	0,40 p=0,22	0,05 p=0,89
міРНК-27	0,15 p=0,65	0,29 p=0,38	0,10 p=0,77	-0,03 p=0,93
міРНК-30	-0,07 p=0,84	0,64 p=0,03	-0,10 p=0,77	0,50 p=0,11
міРНК-139	0,26 p=0,45	-0,23 p=0,49	-0,50 p=0,12	-0,60 p=0,05
міРНК-155	0,24 p=0,47	-0,02 p=0,96	0,10 p=0,30	0,31 p=0,35
міРНК-200	0,23 p=0,50	-0,49 p=0,12	-0,50 p=0,12	-0,78 p=0,001
міРНК-205	0,08 p=0,82	0,53 p=0,10	0,30 p=0,37	0,69 p=0,02
міРНК-335	-0,20 p=0,56	0,15 p=0,65	0,00 p=1,0	0,10 p=0,76
міРНК-497	0,37 p=0,26	0,25 p=0,47	0,50 p=0,12	-0,01 p=0,98
міРНК-663	-0,09	0,39	0,30	0,58

	p=0,79	p=0,24	p=0,37	p=0,06
--	--------	--------	--------	--------

Примітки: за шкалою Чеддока: 0,3 практично відсутній; 0,3-0,5 слабкий; 0,5-0,7 істотний; 0,7-0,9 сильний.

Таблиця 4.15

Кореляція між рівнем експресії міРНК та деякими імуногістохімічними характеристиками пухлин хворих на люмінальний Б РМЗ (n=31)

міРНК	Імуногістохімічні показники пухлин (%)			
	ER ⁺	PR ⁺	HER2-neu ⁺	Ki-67, %
міРНК-25	-0,08 p=0,66	-0,06 p=0,74	-0,53 p=0,05	-0,32 p=0,08
міРНК-27	-0,28 p=0,13	-0,15 p=0,43	0,52 p=0,06	0,32 p=0,08
міРНК-30	-0,18 p=0,33	0,12 p=0,52	0,28 p=0,32	0,26 p=0,15
міРНК-139	-0,20 p=0,29	-0,14 p=0,45	0,25 p=0,38	0,22 p=0,23
міРНК-155	0,07 p=0,72	0,01 p=0,97	-0,35 p=0,23	-0,35 p=0,05
міРНК-200	0,01 p=0,94	0,35 p=0,05	0,21 p=0,46	0,12 p=0,51
міРНК-205	0,01 p=0,95	-0,04 p=0,82	-0,13 p=0,65	-0,14 p=0,44
міРНК-335	0,00 p=0,98	0,02 p=0,93	-0,19 p=0,51	0,00 p=1,0
міРНК-497	-0,13 p=0,49	0,03 p=0,86	-0,15 p=0,61	-0,17 p=0,36
міРНК-663	0,12 p=0,50	0,04 p=0,82	0,01 p=0,97	0,07 p=0,70

Достовірного зв'язку між кількісними показниками HER-2/neu та міРНК не було виявлено при жодному молекулярному типі РМЗ. При цьому тенденцію на позитивний зв'язок відмічено щодо міРНК-27 ($Rho=0,52$, $p=0,06$) у категорії хворих з Люмінальним Б підтипом РМЗ і міРНК-335 у категорії тричі негативного РМЗ, а тенденцію на негативну залежність відмічено щодо міРНК-25 ($Rho=-0,53$, $p=0,05$) у хворих з люмінальним Б підтипом.

У хворих на тричі негативний тип РМЗ не виявлено зв'язку між рівнем експресії міРНК та показниками експресії PR, HER-2neu, Ki-67 (табл. 4.16).

Таблиця 4.16

Кореляція між рівнем експресії міРНК та деякими імуногістохімічними характеристиками пухлин хворих на тричі негативний РМЗ (n=18)

міРНК	Імуногістохімічні показники пухлин (%)		
	PR ⁺	HER2-neu ⁺	Ki-67, %
міРНК-25	-0,10 p=0,70	0,27 p=0,27	-0,25 p=0,31
міРНК-27	0,05 p=0,85	0,07 p=0,79	-0,05 p=0,86
міРНК-30	0,20 p=0,43	0,31 p=0,22	-0,02 p=0,93
міРНК-139	0,41 p=0,10	-0,31 p=0,22	-0,17 p=0,51
міРНК-155	0,26 p=0,32	-0,20 p=0,42	-0,19 p=0,46
міРНК-200	0,41 p=0,10	-0,31 p=0,22	-0,20 p=0,43
міРНК-205	-0,10 p=0,70	0,17 p=0,50	0,05 p=0,84
міРНК-335	-0,05 p=0,85	0,44 p=0,07	-0,22 p=0,39
міРНК-497	0,05 p=0,85	0,17 p=0,50	-0,37 p=0,13
міРНК-663	-0,05 p=0,85	-0,17 p=0,50	0,06 p=0,80

Результати проведеного кореляційного аналізу між експресією ER, PR, та HER-2/neu з Ki-67 у трьох молекулярних типах РМЗ не виявили жодного достовірного зв'язку (табл. 4.17). З огляду на ці дані було вирішено провести кореляційний аналіз за умов розподілу випадків на позитивний та негативний статус експресії маркера (табл. 4.18).

Таблиця 4.17

**Кореляція між рівнем Ki-67 та деякими імуногістохімічними
характеристиками РМЗ (n=18)**

Молекулярний підтип	ER	PR	HER-2neu
Люмінальний А	-0,55 p=0,07	0,39 p=0,21	0,14 p=0,67
Люмінальний Б	-0,25 p=0,16	-0,03 p=0,86	0,33 p=0,23
HER-2neu	-	-	*
Тричі негативний	-	-0,39 p=0,11	-0,31 p=0,18

Примітка. * нульова дисперсія у вибірці не дозволяє проведення кореляційного аналізу

Результати вказують на те, що у хворих на РМЗ із позитивною експресією ER (n=42) у пухлинах не виявлено зв'язок між рівнями досліджуваних 10-ти міРНК та кількісною характеристикою імуногістохімічної оцінки ER. У хворих на РМЗ з позитивною експресією PR (n=33) у пухлинах мала місце достовірно негативна залежність щодо міРНК-139. При цьому у категорії хворих з понад 20% позитивної експресії PR на клітинах (n=27) рівень кореляції та її напрям не відрізнявся від загальної вибірки випадків з PR+. У хворих на РМЗ з позитивною експресією HER-2/neu (n=20) кореляція виявилася негативною щодо міРНК-25. Показник проліферативного індексу Ki-67 мав достовірно негативну кореляцію щодо експресії рецепторів до естрогенів (ER+).

Таблиця 4.18

**Кореляція між рівнем експресії міРНК та позитивним статусом
пухлини щодо ER, PR та HER-2/neu**

Показник	Імуногістохімічні показники пухлин			
	ER ⁺ n=42	PR ⁺ , n=33	PR ⁺ , ≥20% n=27	HER-2neu ⁺ , n=20
Ki-67, %	-0,23 p=0,13	0,15 p=0,38	0,26 p=0,17	0,31 p=0,16
міРНК-25	-0,06 p=0,70	-0,08 p=0,64	-0,13 p=0,52	-0,59 p=0,01
міРНК-27	-0,20 p=0,21	-0,21 p=0,25	-0,36 p=0,07	0,21 p=0,38
міРНК-30	-0,16 p=0,30	0,14 p=0,45	-0,09 p=0,66	0,13 p=0,57
міРНК-155	0,11 p=0,47	-0,03 p=0,86	0,12 p=0,56	-0,04 p=0,85
міРНК-139	-0,10 p=0,55	-0,40 p=0,02	-0,44 p=0,02	0,38 p=0,10
міРНК-200	0,01 p=0,95	-0,04 p=0,83	-0,11 p=0,59	0,30 p=0,19
міРНК-205	0,03 p=0,87	0,12 p=0,49	0,19 p=0,34	-0,17 p=0,47
міРНК-335	0,00 p=0,98	0,19 p=0,28	0,14 p=0,47	-0,27 p=0,24
міРНК-497	-0,06 p=0,71	0,03 p=0,86	0,06 p=0,77	-0,37 p=0,10
міРНК-663	0,07 p=0,64	0,20 p=0,25	0,14 p=0,43	0,03 p=0,91

Підсумок:

- 1) профіль експресії 10-ти досліджуваних міРНК в плазмі крові вказує на наявність позитивних та негативних залежностей між парами у здорових осіб та хворих на РМЗ. У здорових осіб заслуговують на подальші дослідження міРНК-25, міРНК-205 та міРНК-200 , тоді як у хворих на РМЗ виявлено множинні кореляційні залежності, які позитивно пов'язані з міРНК-25;
- 2) рівень експресії міРНК у плазмі крові відрізняється залежно від віку здорових та хворих жінок: після до 45 років зростає рівень міРНК-335, тоді як у здорових міРНК-25 знижується;
- 3) у хворих на РМЗ виявлено тенденцію до зростання рівня експресії міРНК-497 при IIIA-IV стадії і міРНК-200 при IV стадії, зменшення рівня експресії міРНК-27 при IIB-IV стадії;
- 4) виявлено позитивну залежність між рівнем експресії міРНК-30 та експресією PR;
- 5) не виявлено достовірної залежності між рівнем експресії міРНК та молекулярними підтипами РМЗ (люмінальний А, люмінальний Б, HER2/neu позитивний, тричі негативний). При цьому мала місце негативна кореляція між експресією міРНК-139 та рівнем експресії PR у PR⁺-пухлинах, негативна кореляція між міРНК-25 і експресією HER-2 у HER-2/neu⁺-пухлинах:

Результати досліджень, представлені у розділі 4 опубліковані у [280,281,283].

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

На сучасному етапі методи діагностики та лікування онкологічної патології зазнають інтенсивного розвитку. Логічним продовженням еволюційного прогресу у покращенні результатів терапії в 21 столітті стало поступове і невідворотне впровадження в клінічну практику принципів персоніфікованої медицини. У сучасних роботах дослідників прослідковується очевидна тенденція до підготовки вагомого підґрунтя для скорочення термінів від отримання перших результатів застосування новітніх методів діагностики та лікування в рамках клінічних досліджень до імплементації їх у повсякденну лікарську практику.

Оцінка молекулярних типів РМЗ, а також визначення чутливості або резистентності пухлин до медикаментозної терапії поступово стають повсякденними інструментами клінічного моніторингу і суттєво впливають на результати лікування хворих [153-155]. Але навіть за умов врахування біологічних особливостей пухлини, стандартні схеми лікування, які включають оперативне лікування, ПХТ, ПТ, антигормональну, таргетну терапію, імунотерапію у багатьох випадках не досягають бажаної мети, про що свідчать дані з публікацій 2024 року [156-159]. Тому на сучасному етапі дослідники і клініцисти, зокрема і ми, віддають перевагу стратегіям застосування більш персоналізованого підходу до лікувальної тактики у хворих на РМЗ з використанням комплексу лікувальних впливів у конкретної пацієнтки після вивчення чутливості пухлини до засобів ХТ, застосування таргетної терапії, того чи іншого профілю міРНК, що підтверджено у дослідженнях різних авторів [160-162].

В ході планування нашого дослідження було враховані отримані дослідниками дані, які свідчать про залежність ефективності терапії від молекулярних типу пухлини, а також про підтверджений високий ризик

рецидивів і метастазів у тих пацієток, яким діагноз був встановлений пізніше ніж на I стадії захворювання [153, 155, 157, 158].

Показники загальної 3-річної виживаності в досліджуваній та контрольній групах становили $92,06 \pm 3,8\%$ та $82,3 \pm 5,0\%$ відповідно, тоді як 5-річної – $88,2 \pm 5,0\%$ та $80,4 \pm 10,5\%$ відповідно. Різниця зазначених показників статистично достовірна ($p = 0,04$). Показники безрецидивної 3-річної виживаності в досліджуваній та контрольній групах становили $72,4 \pm 6,7\%$ та $76,5 \pm 8,4\%$ відповідно, а 5-річної – $58,6 \pm 9,0\%$ та $31,7 \pm 9,5\%$ відповідно. Різниця статистично достовірна лише для показників 5-річної безрецидивної виживаності ($26,9\%$, $p = 0,03$).

Таким чином, отримані дані дослідження переконливо демонструють достовірне підвищення показників безрецидивної та загальної 3 і 5 –річної виживаності хворих на РМЗ у групі пацієток, яким НПХТ проводилася в після визначення індивідуальної чутливості пухлинних клітин до протипухлинних лікарських засобів.

Отже, отримані дані підтверджують доцільність визначення чутливості пухлини до ПХТ перед початком терапії і значно доповнюють сучасні клінічні дані про ефективність комбінованої терапії хворих на РМЗ різних молекулярних типів, які представлені в сучасній літературі [153, 154, 156, 159].

Завдяки аналізу рівня експресії міРНК у плазмі крові пацієток визначено тенденції до їх кореляції з клінічним перебігом захворювання, що може бути обгрунтованою відправною точкою для розробки індивідуальної стратегії терапії. При оцінці рівнів експресії міРНК встановлено, що вікові характеристики пацієток мали значення щодо відмінностей у експресії міРНК-27 та міРНК-497 в рівній мірі як для групи хворих, які одержували НПХТ, так і після АПХТ. При цьому експресія цих 2-х міРНК мала протилежну залежність, рівень експресії міРНК-27 достовірно був меншим у пременопаузальних жінок і зростав із віком, а рівень експресії міРНК-497 не був пов'язаний з віком.

Порівняно із здоровими жінками у хворих з РМЗ має тенденцію до зростання рівня експресії міРНК-497 при ІІА-ІV стадії і міРНК-200 при ІV стадії, або зменшення рівня експресії міРНК-27 при ІІВ-ІV стадії. Виявлено статистично значуще зменшення рівня експресії міРНК-25 після лікування за критерієм Уїлкоксона і тенденцію до зменшення рівня експресії міРНК-335. Також слід зазначити, що міРНК-25, -27, -335, -497 і -663 заслуговують на увагу щодо вивчення їх ролі у розвитку РМЗ та оцінки як потенційних показників ефективності або чутливості до лікування. За такого підходу міРНК-25 є найбільш перспективною з 10-ти, оскільки має тенденцію до зростання у хворих, особливо при стадії ІІА.

Отримані у нашому дослідженні дані підтверджують перспективи використання даних аналізу експресії зазначених міРНК з метою оцінки ефективності лікування та прогнозу клінічного перебігу захворювання у хворих на РМЗ. Більш того, отримані в ході дослідження дані логічно продовжують і значно доповнюють накопичений масив наукової інформації щодо ролі міРНК в клінічному моніторингу хворих на РМЗ [161,163,165].

На наш погляд, для підвищення ефективності лікування РМЗ слід активно досліджувати множинні зміни міРНК, розробляти діагностичні панелі найбільш значущих міРНК щодо молекулярного типу РМЗ та їх потенційного зв'язку з чутливістю пухлин до хіміотерапії [168]. Вивчення рівнів експресії міРНК та виявлення кореляцій між ними та клінічною картиною РМЗ вказує на важливість цього напрямку в лікуванні онкохворих, особливо у молодих жінок, про що свідчать дані сучасної світової літератури, зокрема 2024 року [169-172].

Також слід підкреслити, що у світі і натеper не припиняються доклінічні дослідження, що оцінюють зміни в експресії та функції міРНК, які можуть бути пов'язані з різними молекулярними типами РМЗ, ґрунтуються на використанні або клітинних ліній *in vitro*, або експериментальних моделей *in vivo*. У цьому контексті цікавими представляються дані, що надмірна експресія міРНК-526b/ міРНК-655 у метастатичних клітинних лініях РМЗ

сприяє більш агресивному фенотипу раку як *in vitro*, так і *in vivo*, і їх експресія значно модулюється гіпоксією [38,163,165]. Тим більш логічним стає припущення, що взаємодія міРНК з некодуючою РНК (lncRNA) є критичною для пов'язаної з міРНК експресії генів. У статтях [39,40,153,159] показано, що дві lncRNAs, металотіонеїн 1J (MT1JP) і гепатоцитарний ядерний фактор 1 гомеобокс А-антисмислова РНК 1 (HNF1A-AS1), націлені на специфічні міРНК, відіграючи роль у онкогенному процесі. Крім того, надекспресія міРНК-34a була виявлена в тканинах РМЗ і клітинних лініях РМЗ порівняно з непухлинними тканинами та клітинними лініями [41,42], а також підтверджено, що міРНК-34a модулює шлях Wnt/ β -катеніну в неметастатичних клітинах MCF-7, викликаючи зниження їх проліферації, інвазії та міграції як *in vitro*, так і *in vivo* [43, 154,159].

У нашому дослідженні приділено основну увагу персоналізованому лікуванню хворих на РМЗ, яке ґрунтується на оцінці надійних прогностичних біомаркерів. Адже такі клініко-патологічні зміни як вік на момент постановки діагнозу, стадія захворювання, а також ступінь злоякісності пухлини, забезпечують уявлення про очікуваний результат, обумовлюють індивідуальні особливості передопераційного та хірургічного планування, а також впливають на процеси реабілітації, що співпадає з матеріалами представленими в літературі [182,189,190,199,205].

У той час як молекулярна ера змінила парадигму в бік охоплення внутрішніх біологічних параметрів пухлини, які інформують про рішення щодо лікування та прогнози, ступінь важкості клінічного перебігу захворювання залишається першорядним для передопераційного хірургічного планування. Рутинне дослідження експресії ER, PgR, HER2neu та індексу проліферації Ki-67 сприяє точному прогнозу за допомогою внутрішнього молекулярного субтипуювання поряд із сучасними досягненнями, що включають особливості мікрооточення пухлини, важливі для інформування про прогноз [191,192]. Більш того, зміни в імунних клітинах в мікрооточенні пухлини можуть призвести до пригнічення

протипухлинної імунної відповіді і, отже, до прогресування РМЗ, при цьому ключовими медіаторами цього процесу є міРНК, які вивільняються пухлинними клітинами, накопичуються в асоційованих з пухлиною макрофагах і посилюють міграцію та інфільтрацію фагоцитів, утворюючи мікрооточення, що сприяє розвитку пухлини [191-193].

Встановлення міток в зону локалізації пухлини перед або під час курсів НПХТ забезпечило значно ефективнішу і достовірну візуалізацію пухлини перед операцією і сприяло проведенню органозберігаючого оперативного втручання.

Відсутність мастектомій у досліджуваній групі в порівнянні з контрольною, як агресивно-необґрунтованого методу хірургічного лікування також доводить ефективність передопераційного моніторингу міРНК в плазмі крові, що дало можливість персоніфікованого підбору алгоритмів ПХТ, завдяки чому зменшився обсяг тканини первинної пухлини залози та стала можливою органозберігаюча операція.

Зменшення кількості випадків післяопераційного та постпроменевого лімфостазу верхньої кінцівки стало можливим завдяки не агресивній лімфодисекції- надання переваги дисекції сигнального лімфовузла, а не лімфаденектоміям 1-3 рівнів. В свою чергу саме внаслідок підібраної ефективної НПХТ дана операція і стала можливою.

Опромінення на сучасному лінійному прискорювачі скоротило кількість місцевих постпроменевих опіків та лімфостазів у досліджуваній групі в порівнянні з контрольною, ПТ якій виконували на кобальтовому опромінювачі.

Звертаємо увагу на те, що моніторинг хворих на РМЗ обов'язково повинен включати дослідження маркерів кісткової резорбції і остеогенезу, так як підвищення їх вмісту у крові і сечі дозволяє запідозрити метастатичне ураження кісток на 3-6 місяців раніше клінічної і радіологічної маніфестації пухлинного процесу з метастазуванням в кістки. Після виявлення у хворих ознак загрози патологічного перелому кістки або його наявності обумовлює

проведення хірургічного втручання в обсязі видалення патологічного вогнища в кістці з заміщенням дефекту ендопротезом.

Візуалізація пухлинного ураження кістки за рахунок друку 3D моделі, планування хірургічного втручання – видалення пухлини і заміщення дефекту адекватним ендопротезом, що забезпечує його надійну фіксацію, значно скорочує тривалість хірургічного втручання, зменшує об'єм крововтрати, що позитивно впливає на клінічний перебіг післяопераційного періоду і віддалені результати лікування.

Персоніфікація лікування хворих на пухлинні ураження кісток сприяє суттєвому зниженню показника післяопераційних ускладнень після ендопротезування великих суглобів та підвищенню показника загальної трирічної виживаності, а також поліпшенню якості життя після проведеного лікування.

Результати проведеного дослідження є аргументами на користь підвищення ефективності лікування хворих на РМЗ за рахунок активного вивчення множинних змін міРНК та розробки діагностичних панелей найбільш значущих міРНК щодо молекулярного типу РМЗ та їх потенційного зв'язку з чутливістю пухлин до хіміотерапії. Отримані дані не тільки розширюють розуміння важливих взаємозв'язків між рівнями експресії міРНК і клінічним перебігом РМЗ, але й надають підґрунтя для удосконалення сучасних методів персоніфікованого лікування.

Таким чином, внаслідок проведеного дослідження нам вдалося розширити наукове обґрунтування вирішення актуальної для сучасної онкології задачі – підвищення ефективності лікування хворих на РМЗ шляхом розробки діагностично-лікувального алгоритму, який включає: вивчення можливостей персоналізації діагностики, лікування та моніторингу клінічного перебігу захворювання із застосуванням схем ПХТ після визначення індивідуальної чутливості пухлинних клітин до цитостатичної дії та створення діагностичної панелі міРНК (Рис.5.1).



Рисунок 5.1 Порівняння оптимізованого і стандартного алгоритму діагностики і лікування хворих на РМЗ.

Результати дослідження доводять, що комплексна оцінка біологічних маркерів клінічного перебігу онкологічного процесу відіграє вирішальну роль у розширенні можливостей застосування органозберігаючих хірургічних втручань.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вперше представлено нове наукове обґрунтування вирішення актуальної для сучасної онкології задачі – підвищення ефективності лікування хворих на РМЗ шляхом розробки діагностично-лікувального алгоритму, який включає персоналізацію діагностики, лікування та моніторингу клінічного перебігу захворювання після визначення індивідуальної чутливості пухлинних клітин до цитостатичної дії хіміопрепаратів та дослідження панелі міРНК.

1. Застосування оптимізованого діагностично-лікувального алгоритму у хворих, яким лікування проводилося з урахуванням чутливості пухлини до ПХТ в неоад'ювантному режимі порівняно з хворими, яким проводилася ПХТ за стандартними протоколами, призвело до достовірного підвищення показників ефективності лікування хворих на РМЗ, а саме показників загальної 3-річної виживаності на 8,0%, а 5-річної - на 15,0% ($p < 0.05$).

2. Проведення моніторингу клінічного перебігу РМЗ у хворих на метастатичні ураження кісток показало, що в рамках спостереження пацієнток необхідно обов'язково досліджувати маркери кісткової резорбції і остеогенезу, зокрема С-кінцевий телопептид, дезоксипіридинолін, тартратрезистентну кислоту фосфатазу, кістково-лужну фосфатазу, остеокальцин, так як підвищення їх вмісту у крові і сечі дозволяє запідозрити метастатичне ураження кісток на 3-6 місяців раніше клінічної і радіологічної маніфестації пухлинного процесу з метастазуванням у кістки.

3. Виявлення у хворих ознак загрози патологічного перелому кістки або його наявність обумовлює своєчасне проведення хірургічного втручання в обсязі видалення патологічного вогнища в кістці із заміщенням дефекту ендопротезом, що невідворотно призводить до значного подовження тривалості та поліпшення якості їх життя: показник загальної трирічної сягав 43,6%, а соціальна активність підвищилася на 39 балів.

4. Встановлено достовірне підвищення показників безрецидивної та загальної 3- і 5 –річної виживаності хворих на РМЗ у групі пацієток, яким НПХТ проводилася в після визначення індивідуальної чутливості пухлинних клітин до протипухлинних лікарських засобів. Зокрема, показники загальної 3-річної виживаності в досліджуваній та контрольній групах становили $92,06 \pm 3,8\%$ та $82,3 \pm 5,0\%$, відповідно, а 5-річної – $88,2 \pm 5,0\%$ та $80,4 \pm 10,5\%$ відповідно. Різниця у показниках безрецидивної виживаності була достовірною лише при аналізі 5-річної виживаності хворих досліджуваної та контрольної груп - $58,6 \pm 9,0\%$ vs $31,7 \pm 9,5\%$ ($p = 0,03$).

5. Аналіз рівня експресії міРНК у здорових жінок та хворих на РМЗ виявив деякі достовірні відмінності із урахуванням фактора віку. У здорових жінок віком до 45 років рівень експресії міРНК-205 був більшим ($p=0,01$), а рівень експресії міРНК-25 меншим ($p=0,04$) ніж у жінок віком 45 років і старше. У хворих на РМЗ виявлено достовірне зростання рівня експресії міРНК-27 та зниження рівня експресії міРНК-335 у віковій категорії 45 років і старше, проти такого у групі порівняння. Водночас, рівень експресії міРНК-335 та -497 був істотно більшим, а міРНК-27 – меншим у хворих жінок до 45 років порівняно із здоровими жінками, тоді як у хворих старшого віку рівень експресії міРНК-663 і -205 був достовірно вищим, аніж у здорових жінок даної вікової категорії.

6. У хворих на РМЗ віком 45 років і старше при АПХТ констатовано вищі показники міРНК-27, -497, тоді як при НПХТ - менші значення міРНК-497, аніж у жінок віком до 45 років, що може бути використано при виборі схем ПХТ. В процесі проведення НПХТ виявлено достовірне зменшення рівня експресії міРНК-25 – потенційного маркера ефективності лікування.

7. Виявлено достовірне зростання рівня експресії циркулюючих міРНК-25 у хворих на РМЗ при IIIA стадії та тенденцію до зростання рівня експресії міРНК-497 при IIIA-IV стадії, міРНК-200 при IV стадії та зменшення рівня експресії міРНК-27 при IIB-IV стадії захворювання.

8. Серед хворих на різні молекулярні типи РМЗ встановлено ряд достовірних кореляційних зв'язків між експресією міРНК та основними імуногістохімічними характеристиками пухлин лише при люмінальному А РМЗ: між рівнем експресії міРНК-30 та RP ($r=0,64$, $p=0,03$), міРНК-200 та Ki-67 ($r=-0,78$, $p=0,0001$), міРНК-205 та Ki-67 ($r=0,69$, $p=0,02$).

9. На відміну від загально прийнятого маршруту пацієнтки за схемою «діагностика – лікування – оцінка ефективності – моніторинг», оптимізований діагностично-лікувальний протокол включає: діагностику з урахуванням молекулярно-біологічних підтипів пухлини та її стадійності, а також оцінку чутливості пухлинних клітин до хіміотерапії; органозберігаюче хірургічне втручання з обов'язковим вивченням лікувального патоморфозу пухлини; на основі оцінки лікувального патоморфозу – прийняття рішення щодо продовження хіміотерапевтичного протоколу в АПХТ-режимі або його корекції.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Діагностичні заходи у хворих на РМЗ перед початком лікування обов'язково повинні завершуватися визначенням чутливості пухлинних клітин до протипухлинних лікарських засобів у кожної конкретної пацієнтки.

2. У хворих на РМЗ під час клінічного моніторингу перебігу захворювання доцільно проводити скринінг маркерів остеолізису та остеогенезу з метою своєчасної діагностики метастазів у кістки.

3. Оптимізований діагностично-лікувальний алгоритм може бути використаний в клінічній практиці онкологічних стаціонарів з метою підвищення ефективності лікування хворих на РМЗ.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Chekhun, V., Borikun, T., Mushii, O., Zadvornyi, T., Martyniuk O., Kashuba, E., Lukianova, N. (2024). Expression profile of miR-145, -182, -21, -27a, -29b, and -34a in breast cancer patients of young age. *Experimental Oncology*, 45(4), 421–431.
2. Lukianova N, Mushii O, Zadvornyi T, Chekhun V. Development of an algorithm for biomedical image analysis of the spatial organization of collagen in breast cancer tissue of patients with different clinical status. *FEBS Open Bio*. 2024 Apr;14(4):675-686.
3. Siegel RL, Giaquinto AN, Jemal A. Cancer statistics, 2024. *CA Cancer J Clin*. 2024 Jan-Feb;74(1):12-49.
4. Golestan A, Tahmasebi A, Maghsoodi N, Faraji SN, Irajie C, Ramezani A. Unveiling promising breast cancer biomarkers: an integrative approach combining bioinformatics analysis and experimental verification. *BMC Cancer*. 2024 Jan 31;24(1):155.
5. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (Baltimore)*. 2024 Jan 19;103(3):e36905.
6. Lukianova NY, Borikun TV, Chekhun VF. Tumor microenvironment-derived miRNAs as prognostic markers of breast cancer. *Exp Oncol*. 2019 Sep;41(3):242-247.
7. VF Chekhun, N Yu Lukianova, TV Borikun, NA Bezdieniezhnykh, IV Shepelenko, VM Bazas, AN Klyusov. The clinical significance of tumor mir-122,-155,-182, and-200b expression in patients with breast cancer. *Sci. innov*. 2017. 13 (5): 63-69.
8. Zablon FM, Desai P, Dellinger K, Aravamudhan S. Cellular and Exosomal MicroRNAs: Emerging Clinical Relevance as Targets for Breast Cancer Diagnosis and Prognosis. *Adv Biol (Weinh)*. 2024 Jan 22:e2300532.

9. Jordan-Alejandre E, Campos-Parra AD, Castro-López DL, Silva-Cázares MB. Potential miRNA Use as a Biomarker: From Breast Cancer Diagnosis to Metastasis. *Cells*. 2023 Feb 6;12(4):525. doi: 10.3390/cells12040525. PMID: 36831192; PMCID: PMC9954167.
10. Mundt F, Rajput S, Li S, Ruggles KV, Mooradian AD, Mertins P, et al. (2018). Mass Spectrometry-Based Proteomics Reveals Potential Roles of NEK9 and MAP2K4 in Resistance to PI3K Inhibition in Triple-Negative Breast Cancers. *Cancer Research*, 78(10), 2732, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1990.
11. Sehgal V, & Ram PT (2013). Network Motifs in JNK Signaling. *Genes Cancer*, 4(9–10), 409–413.
12. Trayes KP, Cokenakes SEH. Breast Cancer Treatment. *Am Fam Physician*. 2021 Aug 1;104(2):171-178.
13. Obeagu EI, Obeagu GU. Breast cancer: A review of risk factors and diagnosis. *Medicine (Baltimore)*. 2024 Jan 19;103(3):e36905.
14. Burguin A, Diorio C, Durocher F. Breast Cancer Treatments: Updates and New Challenges. *J Pers Med*. 2021 Aug 19;11(8):808.
15. Baclig NV, McCann KE. Updates in the treatment of HR+HER2- breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2024 Feb 1;36(1):57-63.
16. Hanna K, Mayden K. Chemotherapy Treatment Considerations in Metastatic Breast Cancer. *J Adv Pract Oncol*. 2021 Mar;12(Suppl 2):6-12.
17. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res*. 2019;47:D155–D162. doi: 10.1093/nar/gky1141.
18. Tastsoglou S., Miliotis M., Kavakiotis I., Alexiou A., Gkotsi E.C., Lambropoulou A., Lygnos V., Kotsira V., Maroulis V., Zisis D., et al. PlasmIR: A manual collection of circulating microRNAs of prognostic and diagnostic value. *Cancers*. 2021;13:3680.
19. Khadka VS, Nasu M, Deng Y, Jijiwa M. Circulating microRNA Biomarker for Detecting Breast Cancer in High-Risk Benign Breast Tumors. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 20;24(8):7553.

20. Grimaldi AM, Salvatore M, Incoronato M. miRNA-Based Therapeutics in Breast Cancer: A Systematic Review. *Front Oncol*. 2021 May 5;11:668464.
21. Muñoz JP, Pérez-Moreno P, Pérez Y, Calaf GM. The Role of MicroRNAs in Breast Cancer and the Challenges of Their Clinical Application. *Diagnostics (Basel)*. 2023 Sep 28;13(19):3072.
22. Al Sukhun S, Koczwara B, Temin S, Arun BK. Systemic Treatment of Patients With Metastatic Breast Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline Q and A. *JCO Glob Oncol*. 2024 Jan;10:e2300411.
23. Kantor ED, O'Connell K, Ergas IJ, Valice E, Roh JM, Bhimani J, Heon N, Griggs JJ, Lee J, Bowles EJ, Rivera DR, Kolevska T, Bandera EV, Kushi LH. Assessment of breast cancer chemotherapy dose reduction in an integrated healthcare delivery system. *Breast Cancer Res Treat*. 2024 Feb;203(3):565-574.
24. Storme GA. Breast Cancer: Impact of New Treatments? *Cancers (Basel)*. 2023 Apr 8;15(8):2205. doi: 10.3390/cancers15082205. Erratum in: *Cancers (Basel)*. 2023 Sep 12;15(18): PMID: 37190134; PMCID: PMC10136973.
25. Thomas P.S. Diagnosis and Management of High-Risk Breast Lesions. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN*. 2018;16:1391-1396.
26. Sbaraglia M., Bellan E., Dei Tos A.P. The 2020 WHO classification of soft tissue tumours: News and perspectives. *Pathologica*. 2020;113:70–84. doi: 10.32074/1591-951X-213.
27. Ashraf FB, Alam SMM, Sakib SM. Enhancing breast cancer classification via histopathological image analysis: Leveraging self-supervised contrastive learning and transfer learning. *Heliyon*. 2024 Jan 9;10(2):e24094. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e24094. PMID: 38293493; PMCID: PMC10827455.
28. Ren Y, Gao Y, Du W, Qiao W, Li W, Yang Q, Liang Y, Li G. Classifying breast cancer using multi-view graph neural network based on multi-omics data. *Front Genet*. 2024 Feb 20;15:1363896. doi: 10.3389/fgene.2024.1363896. PMID: 38444760; PMCID: PMC10912483.

29. Wambua MD, Degu A, Tegegne GT. Treatment outcomes and its associated factors among breast cancer patients at Kitui Referral Hospital. *SAGE Open Med.* 2022 Jan 8;10:20503121211067857.
30. Colomer R, González-Farré B, Ballesteros AI, Peg V, Bermejo B, Pérez-Mies B, de la Cruz S, Rojo F, Pernas S, Palacios J. Biomarkers in breast cancer 2024: an updated consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin Transl Oncol.* 2024 Jun 13.
31. Boussen H, Berrazaga Y, Sherif Kullab, Manai M, Berrada N, Mejri N, Siala I, Levine PH, Cristofanilli M. Inflammatory breast cancer: Epidemiologic data and therapeutic results. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2024;384:1-23.
32. Hubbard RA, Su YR, Bowles EJA, Ichikawa L, Kerlikowske K, Lowry KP, Miglioretti DL, Tosteson ANA, Wernli KJ, Lee JM. Predicting five-year interval second breast cancer risk in women.
33. Boussen H, Berrazaga Y, Sherif Kullab, Manai M, Berrada N, Mejri N, Siala I, Levine PH, Cristofanilli M. Inflammatory breast cancer: Epidemiologic data and therapeutic results. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2024;384:1-23.
34. Omer AA, Bin Dayel SA, Hummedi AS, Almuhaimeed NI. The epidemiological and clinicopathological features of breast cancer in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Med J.* 2024 Mar;45(3):288-294.
35. Marra A, Chandarlapaty S, Modi S. Management of patients with advanced-stage HER2-positive breast cancer: current evidence and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol.* 2024 Mar;21(3):185-202.
36. Iacopetta D, Ceramella J, Baldino N, Sinicropi MS, Catalano A. Targeting Breast Cancer: An Overlook on Current Strategies. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 11;24(4):3643.
37. Matro JM, Li T, Cristofanilli M, Hughes ME, Ottensen RA, Weeks JC, Wong Y-N. Inflammatory Breast Cancer Management in the National Comprehensive Cancer Network: The Disease, Recurrence Pattern, and Outcome. *Clin Breast Cancer.* 2015;15(1):1–7.

38. Inic Z, Zegarac M, Inic M, Markovic I, Kozomara Z, Djuriscic I, et al. Difference between luminal A and luminal B subtypes according to Ki-67, tumor size, and progesterone receptor negativity providing prognostic information. *Clin Med Insights Oncol*. 2014;8:CMO-S18006.
39. Lafci O, Celepli P, Oztekin PS, Kosar PN. DCE-MRI Radiomics Analysis in Differentiating Luminal A and Luminal B Breast Cancer Molecular Subtypes. *Acad Radiol*. 2022.
40. Park S, Koo JA, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012;21(1):50–57. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.07.008> . [PubMed]
41. Krishnamurti U, Silverman JF. HER2 in breast cancer: a review and update. *Adv Anat Pathol*. 2014;21(2):100–107.
42. Figueroa-Magalhães MC, Jelovac D, Connolly RM, Wolff AC. Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast*. 2014;23(2):128–136. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.11.011> .
43. Wang J, Xu B. Targeted therapeutic options and future perspectives for HER2-positive breast cancer. *Signal Transduct Target Ther*. 2019;4:34. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0069-2> . [PMC free article] [PubMed]
44. Pulido C, Vendrell I, Ferreira AR, Casimiro S, Mansinho A, Alho I, et al. Bone metastasis risk factors in breast cancer. *Ecancermedicalscience*. 2017;11:715.
45. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, Jerusalem G. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2016;8:93.
46. Ali-Thompson S, Daly GR, Dowling GP, Kilkenny C, Cox L, McGrath J, AlRawashdeh MM, Naidoo S, Power C, Hill ADK. A bibliometric analysis of HER2-positive breast cancer: 1987-2024. *Front Oncol*. 2024 May 1;14:1355353.
47. Premji SK, O'Sullivan CC. Standard-of-Care Treatment for HER2+ Metastatic Breast Cancer and Emerging Therapeutic Options. *Breast Cancer (Auckl)*. 2024 Feb 25;18:11782234241234418.

48. Sofianidi A, Dumbrava EE, Syrigos KN, Nasrazadani A. Triple-Negative Breast Cancer and Emerging Therapeutic Strategies: ATR and CHK1/2 as Promising Targets. *Cancers (Basel)*. 2024 Mar 13;16(6):1139.
49. Leon-Ferre RA, Jonas SF et al. International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA*. 2024 Apr 2;331(13):1135-1144.
50. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppalapati A, Luu HH, Haydon RC, He TC, Ren G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*. 2018 May 12;5(2):77-106.
51. Koh J, Kim MJ. Introduction of a New Staging System of Breast Cancer for Radiologists: An Emphasis on the Prognostic Stage. *Korean J Radiol*. 2019 Jan;20(1):69-82.
52. Pankaj D, Kumar N, Singh A, Kumar M, Imam ZS, Bhushan V, Jha PK. Clinical Profile of Triple-Negative Breast Cancer: A Hospital-Based Study. *Cureus*. 2024 Feb 1;16(2):e53373. doi: 10.7759/cureus.53373. PMID: 38435145; PMCID: PMC10907967.
53. Al Husban H, Al Rabadi A, Odeh AH, Abu Rumman K, Alkhawaldeh F, Noures H, Abo Ashoor M, Abu Rumman A, Atmeh M, Bawaneh M. Clinical Characteristics and Management of Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) in Jordan: A Retrospective Analysis. *Cureus*. 2024 Jan 27;16(1):e53053. doi: 10.7759/cureus.53053. PMID: 38410339; PMCID: PMC10896140.
54. Yang X, Lin Q, Wang Q. The impact of breast- conserving surgery and modified radical mastectomy on postoperative wound complications in patients with early breast cancer. *Int Wound J*. 2024 Feb 7;21(2):e14685.
55. Mui J, Cheng E, Salindera S. Enhanced recovery after surgery for oncological breast surgery reduces length of stay in a resource limited setting. *ANZ J Surg*. 2024 Jun;94(6):1096-1101.

56. Di Lena É, Wong SM, Iny E, Mashal S, Basik M, Boileau JF, Martel K, Bassel MA, Meterissian S, Prakash I. Oncologic safety of breast conserving surgery after neoadjuvant chemotherapy in patients with multiple ipsilateral breast cancer: A retrospective multi-institutional cohort study. *Eur J Surg Oncol.* 2024 Jun;50(6):108266.
57. Lu G, Jia L, Yang R, Liu Y, Lv Z, Cui J. Primary site surgery of de novo stage IV HER2-positive breast cancer in the era of new drug treatments. *Front Oncol.* 2024 Jan 9;13:1308854.
58. van de Loo ME, Andour L, van Heesewijk AE, Oosterkamp HM, Liefers GJ, Straver ME. Neoadjuvant endocrine treatment in hormone receptor-positive breast cancer: Does it result in more breast-conserving surgery? *Breast Cancer Res Treat.* 2024 May;205(1):5-16.
59. Sasada S, Nagura N, Shimo A, Ogiya A, Saiga M, Seki H, Mori H, Kondo N, Ishitobi M, Narui K, Nogi H, Yamauchi C, Sakurai T, Shien T; Collaborative Study Group of Scientific Research of the Japanese Breast Cancer Society. Impact of radiation therapy for breast cancer with involved surgical margin after immediate breast reconstruction: A multi-institutional observational study. *Eur J Surg Oncol.* 2024 Jun;50(6):108360.
60. Torras I, Cebrecos I, Castillo H, Mension E. Evolution of breast conserving surgery-current implementation of oncoplastic techniques in breast conserving surgery: a literature review. *Gland Surg.* 2024 Mar 27;13(3):412-425.
61. Bhimani J, O'Connell K, Ergas IJ, Foley M, Gallagher GB, Griggs JJ, Heon N, Kolevska T, Kotsurovskyy Y, Kroenke CH, Laurent CA, Liu R, Nakata KG, Persaud S, Rivera DR, Roh JM, Tabatabai S, Valice E, Bowles EJA, Bandera EV, Kushi LH, Kantor ED. Trends in chemotherapy use for early-stage breast cancer from 2006 to 2019. *Breast Cancer Res.* 2024 Jun 13;26(1):101.
62. 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.

63. Smoczynska A, Segal P, Stepień A, Knop K, Jarmolowski A, Pacak A, Szweykowska-Kulinska Z. miRNA Detection by Stem-Loop RT-qPCR in Studying microRNA Biogenesis and microRNA Responsiveness to Abiotic Stresses. *Methods Mol Biol*. 2019;1932:131-150.
64. Sharman Moser S, Apter L, Livnat I, Ginsburg R, Yarden A, Drori M, Drizon A, Chodick G, Siegelmann-Danieli N. Clinical Outcomes of Patients with HER2 Positive Metastatic Breast Cancer to the Brain, with First-Line Trastuzumab, Pertuzumab and Chemotherapy, in a Real-World Setting. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2024 Mar 6;16:105-116.
65. Pak J, Nyrop KA, Muss HB, Forster MK, Lund JL. Quantifying Chemotherapy Delivery in Older and Younger Women With Early-Stage Breast Cancer Using Longitudinal Cumulative Dose. *Oncologist*. 2024 Apr 4;29(4):311-315.
66. Jafer F, Malki S, Akram M, Gulwarisdotter T, Karakatsanis A, Valachis A. Postmastectomy radiation therapy in breast cancer patients with micrometastatic disease in sentinel node dissection: A cohort study and meta-analysis. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2024 Mar 25;46:100770.
67. Chirilă ME, Kraja F, Marta GN, Neves Junior WFP, de Arruda GV, Gouveia AG, Franco P, Poortmans P, Ratosa I. Organ-sparing techniques and dose-volume constraints used in breast cancer radiation therapy - Results from European and Latin American surveys. *Clin Transl Radiat Oncol*. 2024 Feb 19;46:100752.
68. Sheva K, Roy Chowdhury S, Kravchenko-Balasha N, Meirovitz A. Molecular Changes in Breast Cancer Induced by Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2024 Mar 18:S0360-3016(24)00435-8.
69. Demircan NV, Bese N. New Approaches in Breast Cancer Radiotherapy. *Eur J Breast Health*. 2023 Dec 27;20(1):1-7.
70. Jagsi R, Griffith KA, Harris EE, Wright JL, Recht A, Taghian AG, Lee L, Moran MS, Small W Jr, Johnstone C, Rahimi A, Freedman G, Muzaffar M, Haffty B, Horst K, Powell SN, Sharp J, Sabel M, Schott A, El-Tamer M. Omission of Radiotherapy After Breast-Conserving Surgery for Women With Breast Cancer

With Low Clinical and Genomic Risk: 5-Year Outcomes of IDEA. *J Clin Oncol*. 2024 Feb 1;42(4):390-398.

71. Hubbard RA, Su YR, Bowles EJA, Ichikawa L, Kerlikowske K, Lowry KP, Miglioretti DL, Tosteson ANA, Wernli KJ, Lee JM. Predicting five-year interval second breast cancer risk in women with prior breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2024 Jun 7;116(6):929-937.

72. Pauwels E.K.J., Bourguignon M.H. PARP Inhibition and Beyond in BRCA-Associated Breast Cancer in Women: A State-Of-The-Art Summary of Preclinical Research on Risk Reduction and Clinical Benefits. *Med. Princ. Pract*. 2022;31:303–312.

73. Werner H. BRCA1: An Endocrine and Metabolic Regulator. *Front. Endocrinol*. 2022;13:844575.

74. Edwards A., Brennan K. Notch Signalling in Breast Development and Cancer. *Front. Cell Dev. Biol*. 2021;9:692173.

75. Rozenblit M., Hofstatter E., Liu Z., O'Meara T., Storniolo A.M., Dalela D., Singh V., Pusztai L., Levine M. Evidence of accelerated epigenetic aging of breast tissues in patients with breast cancer is driven by CpGs associated with polycomb-related genes. *Clin. Epigenetics*. 2022;14:30.

76. Hashem M, Rehman S, Salhab M. The Role of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)-Targeted Therapies in Early-Stage Breast Cancer: Current Practices, Treatment De-escalation, and Future Prospects. *Cureus*. 2024 Feb 29;16(2):e55230.

77. Jallah JK, Dweh TJ, Anjankar A, Palma O. A Review of the Advancements in Targeted Therapies for Breast Cancer. *Cureus*. 2023 Oct 28;15(10):e47847.

78. Wang J, Wu SG. Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2023 Oct 20;15:721-730.

79. Singh H. Role of Molecular Targeted Therapeutic Drugs in Treatment of Breast Cancer: A Review Article. *Glob Med Genet*. 2023 May 23;10(2):79-86.

80. Sun X, Liu K, Lu S, He W, Du Z. Targeted Therapy and Immunotherapy for Heterogeneous Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 6;14(21):5456.
81. Demir Cetinkaya B, Biray Avci C. Molecular perspective on targeted therapy in breast cancer: a review of current status. *Med Oncol*. 2022 Jul 14;39(10):149.
82. Athreya K., Ali S. Advances on immunotherapy in breast cancer. *Transl. Cancer Res*. 2017;6:30–37. doi: 10.21037/tcr.2017.01.09.
83. Yu L.-Y., Tang J., Zhang C.-M., Zeng W.-J., Yan H., Li M.-P., Chen X.-P. New Immunotherapy Strategies in Breast Cancer. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2017;14:68. doi: 10.3390/ijerph14010068.
84. Hu Z.I., McArthur H.L. Immunotherapy in Breast Cancer: The New Frontier. *Curr. Breast Cancer Rep*. 2018;10:35–40. doi: 10.1007/s12609-018-0274-y.
85. Wei S.C., Levine J.H., Cogdill A.P., Zhao Y., Anang N.-A.A.S., Andrews M.C., Sharma P., Wang J., Wargo J.A., Pe’Er D., et al. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell*. 2017;170:1120–1133.e1117.
86. Soliman H., Khalil F., Antonia S. PD-L1 Expression Is Increased in a Subset of Basal Type Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*. 2014;9:e88557.
87. Mohan N., Hosain S., Zhao J., Shen Y., Luo X., Jiang J., Endo Y., Wu W.J. Atezolizumab potentiates Tcell-mediated cytotoxicity and coordinates with FAK to suppress cell invasion and motility in PD-L1+triple negative breast cancer cells. *OncoImmunology*. 2019;8:e1624128.
88. Fesnak A., June C.H., Levine B.L. Engineered T cells: The promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer*. 2016;16:566–581. doi: 10.1038/nrc.2016.97.
89. Brouck T., Karjalainen K. Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J. Exp. Med*. 1995;181:1653–1659.
90. Kofler D.M., Chmielewski M., Rappl G., Hombach A., Riet T., Schmidt A., A Hombach A., Wendtner C.-M., Abken H. CD28 Costimulation Impairs the

Efficacy of a Redirected T-cell Antitumor Attack in the Presence of Regulatory T cells Which Can Be Overcome by Preventing Lck Activation. *Mol. Ther.* 2011;19:760–767.

91. Zhou R., Yazdanifar M., Das Roy L., Whilding L.M., Gavrill A., Maher J., Mukherjee P. CAR T Cells Targeting the Tumor MUC1 Glycoprotein Reduce Triple-Negative Breast Cancer Growth. *Front. Immunol.* 2019;10:1149.

92. Xia L., Zheng Z., Liu J., Chen Y., Ding J., Xia N., Luo W., Liu W. EGFR-targeted CAR-T cells are potent and specific in suppressing triple-negative breast cancer both in vitro and in vivo. *Clin. Transl. Immunol.* 2020;9:e01135.]

93. Zhu S.-Y., Yu K.-D. Breast Cancer Vaccines: Disappointing or Promising? *Front. Immunol.* 2022;13:828386. doi: 10.3389/fimmu.2022.828386.

94. Burn O.K., Farrand K., Pritchard T., Draper S., Tang C., Mooney A.H., Schmidt A.J., Yang S.H., Williams G.M., A Brimble M., et al. Glycolipid-peptide conjugate vaccines elicit CD8 + T-cell responses and prevent breast cancer metastasis. *Clin. Transl. Immunol.* 2022;11:e1401.

95. Tomasicchio M., Semple L., Esmail A., Meldau R., Randall P., Pooran A., Davids M., Cairncross L., Anderson D., Downs J., et al. An autologous dendritic cell vaccine polarizes a Th-1 response which is tumoricidal to patient-derived breast cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2019;68:71–83.

96. В.В. Зайчук І.Б. Щепотін В.Є. Чешук Г.П. Потебня Г.С. Лісовенко О.В. Пономарьова О.М. Караман А.В. Савоста З.Д. Савцова. Ефективність застосування протипухлинної аутовакцини в лікуванні хворих з різною морфологічною структурою раку молочної залози. *Онкологія* (2006), 8 (1): 70 – 73.

97. G.V. Didenko O.O. Krutz V.N. Bazas V.F. Chekhun. Efficiency of xenogeneic antitumor vaccine in vivo. *Oncology* (2022), 24 (1): 26 – 30.

98. Brabletz T., Kalluri R., Nieto M.A., Weinberg R.A. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2018;18:128–134.

99. Si W., Huang W., Zheng Y., Yang Y., Liu X., Shan L., Zhou X., Wang Y., Su D., Gao J., et al. Dysfunction of the Reciprocal Feedback Loop between

GATA3- and ZEB2-Nucleated Repression Programs Contributes to Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell*. 2015;27:822–836.

100. Siersbaek R., Scabia V., Nagarajan S., Chernukhin I., Papachristou E.K., Broome R., Johnston S.J., Joosten S.E.P., Green A.R., Kumar S., et al. IL6/STAT3 Signaling Hijacks Estrogen Receptor alpha Enhancers to Drive Breast Cancer Metastasis. *Cancer Cell*. 2020;38:412–423. doi: 10.1016/j.ccell.2020.06.007.

101. Brown D.M., Ruoslahti E. Metadherin, a cell surface protein in breast tumors that mediates lung metastasis. *Cancer Cell*. 2004;5:365–374. doi: 10.1016/S1535-6108(04)00079-0.

102. Chen J., Yao Y., Gong C., Yu F., Su S., Chen J., Liu B., Deng H., Wang F., Lin L., et al. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell*. 2011;19:541–555. doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.006.

103. Caswell-Jin J.L., Plevritis S.K., Tian L., Cadham C.J., Xu C., Stout N.K., Sledge G.W., Mandelblatt J.S., Kurian A.W. Change in Survival in Metastatic Breast Cancer with Treatment Advances: Meta-Analysis and Systematic Review. *JNCI Cancer Spectr*. 2018;2:pkv062. doi: 10.1093/jncics/pkv062.

104. Marino N., Woditschka S., Reed L.T., Nakayama J., Mayer M., Wetzel M., Steeg P.S. Breast cancer metastasis: Issues for the personalization of its prevention and treatment. *Am. J. Pathol*. 2013;183:1084–1095. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.012.

105. Houghton SC, Hankinson SE. Cancer Progress and Priorities: Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2021 May;30(5):822-844.

106. Díaz-Casas SE, Briceño-Morales X, Puerto-Horta LJ, Lehmann-Mosquera C, Orozco-Ospino MC, Guzmán-AbiSaab LH, Ángel-Aristizábal J, García-Mora M, Duarte-Torres CA, Mariño-Lozano IF, Briceño-Morales C, Sánchez-Pedraza R. Factors Associated with Time to Progression and Overall Survival in Patients with De Novo Metastatic Breast Cancer: A Colombian Cohort. *Oncologist*. 2022 Mar 4;27(2):e142-e150.

107. Costa MSCR, Fernandes MR, Pereira EEB, Leal DFDVB, Coelho RCC, Menezes EDS, Modesto AAC, Assumpção PP, Burbano RMR, Santos SEBD, Santos NPCD. Breast Cancer: Clinical-Epidemiological Profile and Toxicities of Women Receiving Treatment with Taxanes in the Amazon Region. *J Pers Med*. 2023 Sep 30;13(10):1458.
108. Magno E, Bussard KM. A Representative Clinical Course of Progression, with Molecular Insights, of Hormone Receptor-Positive, HER2-Negative Bone Metastatic Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2024 Mar 17;25(6):3407.
109. Smolarz B, Nowak AZ, Romanowicz H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment (Review of Literature). *Cancers (Basel)*. 2022 May 23;14(10):2569.
110. Baek SY, Kim J, Chung IY, Ko BS, Kim HJ, Lee JW, Son BH, Ahn SH, Lee SB. Clinical Course and Predictors of Subsequent Recurrence and Survival of Patients With Ipsilateral Breast Tumor Recurrence. *Cancer Control*. 2022 Jan-Dec;29:10732748221089412.
111. Feng Y, Spezia M, Huang S, Yuan C, Zeng Z, Zhang L, Ji X, Liu W, Huang B, Luo W, Liu B, Lei Y, Du S, Vuppalapati A, Luu HH, Haydon RC, He TC, Ren G. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis*. 2018 May 12;5(2):77-106.
112. Wu J, Liu H, Hu T, Long M, Zhou X, Wang S. The natural history of breast cancer: a chronological analysis of breast cancer progression using data from the SEER database. *Ann Transl Med*. 2022 Mar;10(6):365.
113. Elaasser B, Arakil N, Mohammad KS. Bridging the Gap in Understanding Bone Metastasis: A Multifaceted Perspective. *Int J Mol Sci*. 2024 Feb 29;25(5):2846.
114. Yağar H, Aytekin MN, Şener Dede D, Şendur MAN, Öztürk R, Yalçın B. Do metastatic volumes measured in breast cancer patients with bone metastases correlate with the numbers of skeletal and extraskeletal events? *Jt Dis Relat Surg*. 2024 Jan 1;35(1):105-111.

115. Young SAE, Heller AD, Garske DS, Rummler M, Qian V, Ellinghaus A, Duda GN, Willie BM, Grüneboom A, Cipitria A. From breast cancer cell homing to the onset of early bone metastasis: The role of bone (re)modeling in early lesion formation. *Sci Adv.* 2024 Feb 23;10(8):eadj0975.
116. Yu X, Zhu L. Nanoparticles for the Treatment of Bone Metastasis in Breast Cancer: Recent Advances and Challenges. *Int J Nanomedicine.* 2024 Feb 23;19:1867-1886.
117. Elaasser B, Arakil N, Mohammad KS. Bridging the Gap in Understanding Bone Metastasis: A Multifaceted Perspective. *Int J Mol Sci.* 2024 Feb 29;25(5):2846.
118. Chopra S, Khosla M, Vidya R. Innovations and Challenges in Breast Cancer Care: A Review. *Medicina (Kaunas).* 2023 May 16;59(5):957.
119. Jagsi R, Mason G, Overmoyer BA, et al.. Inflammatory breast cancer defined: proposed common diagnostic criteria to guide treatment and research. *Breast Cancer Res Treat.* 2022;192:235–43.
120. Pedersen RN, Esen BO, Mellemkjær L, et al.. The incidence of breast cancer recurrence 10-32 years after primary diagnosis. *J Natl Cancer Inst.* 2022;114:391–99.
121. Xia C, Dong X, Li H, et al.. Cancer statistics in China and the United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin Med J (Engl).* 2022;135:584–90.
122. Mahdavi M, Nassiri M, Kooshyar MM, et al.. Hereditary breast cancer; genetic penetrance and current status with BRCA. *J Cell Physiol.* 2019;234:5741–50.
123. Liu H, Shi S, Gao J, et al.. Analysis of risk factors associated with breast cancer in women: a systematic review and meta-analysis. *Transl Cancer Res.* 2022;11:1344–53.
124. Heer E, Ruan Y, Mealey N, et al.. The incidence of breast cancer in Canada 1971-2015: trends in screening-eligible and young-onset age groups. *Can J Public Health.* 2020;111:787–93.

125. Van Ourti T, O'Donnell O, Koç H, et al.. Effect of screening mammography on breast cancer mortality: Quasi-experimental evidence from the rollout of the Dutch population-based program with 17-year follow-up of a cohort. *Int J Cancer*. 2020;146:2201–8.
126. Buist DSM, Abraham L, Lee CI, et al.. Breast biopsy intensity and findings following breast cancer screening in women with and without a personal history of breast cancer. *JAMA Intern Med*. 2018;178:458–68.
127. Maio F, Tari DU, Granata V, et al.. Breast cancer screening during COVID-19 emergency: patients and department management in a local experience. *J Pers Med*. 2021;11:380.
128. Atretkhany KS, Drutskaya MS, Nedospasov SA, et al.. Chemokines, cytokines and exosomes help tumors to shape inflammatory microenvironment. *Pharmacol Ther*. 2016;168:98–112.
129. Mittal S, Brown NJ, Holen I. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18:227–43.
130. Thakur C, Qiu Y, Fu Y, et al.. Epigenetics and environment in breast cancer: new paradigms for anti-cancer therapies. *Front Oncol*. 2022;12:971288.
131. Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. 2020;108:377–96.
132. Fingerhut L, Dolz G, de Buhr N. What is the evolutionary fingerprint in neutrophil granulocytes? *Int J Mol Sci*. 2020;21:4523.
133. Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*. 2016;273:11–28.
134. Hong CW. Current understanding in neutrophil differentiation and heterogeneity. *Immune Netw*. 2017;17:298–306.
135. Hidalgo A, Chilvers ER, Summers C, et al.. The neutrophil life cycles. *Trends Immunol*. 2019;40:584–97.
136. Banerjee S., Wei Z., Tan F., Peck K.N., Shih N., Feldman M., Rebbeck T.R., Alwine J.C., Robertson E.S. Distinct Microbiological Signatures Associated with

Triple Negative Breast Cancer. [(accessed on 15 October 2015)];Sci. Rep. 2015 5:15162. doi: 10.1038/srep15162. Available online: <https://www.nature.com/articles/srep15162/>

137. Smith A., Pierre J.F., Makowski L., Tolley E., Lyn-Cook B., Lu L., Vidal G., Starlard-Davenport A. Distinct Microbial Communities that Differ by Race, Stage, or Breast-Tumor Subtype in Breast Tissues of non-Hispanic Black and non-Hispanic White Women. [(accessed on 16 August 2019)];Sci. Rep. 2019 9:11940. doi: 10.1038/s41598-019-48348-1. Available online: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-48348-1>

138. Thompson K.J., Ingle J.N., Tang X., Chia N., Jeraldo P.R., Walther-Antonio M., Kandimalla K.K., Johnson S., Yao J.Z., Harrington J., et al. A comprehensive analysis of breast cancer microbiota and host gene expression. PLoS ONE. 2017;12:e0188873. doi: 10.1371/journal.pone.0188873.

139. Parida S., Wu S., Siddharth S., Wang G., Muniraj N., Nagalingam A., Hum C., Mistriotis P., Hao H., Talbot C.C., et al. Data from A Procarcinogenic Colon Microbe Promotes Breast Tumorigenesis and Metastatic Progression and Concomitantly Activates Notch and β -Catenin Axes. [(accessed on 6 January 2021)];Cancer Discov. 2021 11:1138–1157. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0537. Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33408241/>

140. Banerjee S., Wei Z., Tian T., Bose D., Shih N.N.C., Feldman M.D., Khoury T., De Michele A. Prognostic correlations with the microbiome of breast cancer subtypes. Cell Death Dis. 2021;12:831. doi: 10.1038/s41419-021-04092-x.

141. Tzeng A., Sangwan N., Jia M., Liu C.C., Keslar K.S., Downs-Kelly E., Fairchild R.L., Al-Hilli Z., Grobmyer S.R., Eng C. Human breast microbiome correlates with prognostic features and immunological signatures in breast cancer. Genome Med. 2021;13:60.

142. Li MR, Liu MZ, Ge YQ, et al.. Assistance by routine CT features combined with 3D texture analysis in the diagnosis of BRCA gene mutation status in advanced epithelial ovarian cancer. Front Oncol. 2021;11:696780.

143. Hu X, Zhang Q, Xing W, et al.. Role of microRNA/lncRNA intertwined with the Wnt/ β -Catenin axis in regulating the pathogenesis of triple-negative breast cancer. *Front Pharmacol.* 2022;13:814971.
144. Thigpen D, Kappler A, Brem R. The role of ultrasound in screening dense breasts—a review of the literature and practical solutions for implementation. *Diagnostics.* 2018;8:20.
145. Vatankhah H, Khalili P, Vatanparast M, et al.. Prevalence of early and late menopause and its determinants in Rafsanjan cohort study. *Sci Rep.* 2023;13:1847.
146. Belachew EB, Sewasew DT. Molecular mechanisms of endocrine resistance in estrogen-positive breast cancer. *Front Endocrinol.* 2021;12:689705.
147. Kim M, Jung MS. Effects of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in women with breast cancer: a structural equation approach with the theory of unpleasant symptoms. *Cancer Nurs.* 2021;44:145–53.
148. Seferin MR, Pinto FR, Leite AKN, et al.. The impact of sentinel lymph node biopsy on the quality of life in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2022;88:434–8.
149. Wang M, Kundu U, Gong Y. Pitfalls of FNA diagnosis of thymic tumors. *Cancer Cytopathol.* 2020;128:57–67.
150. Qaseem A, Snow V, Sherif K, et al.. Clinical Efficacy Assessment Subcommittee of the American College of Physicians. Screening mammography for women 40 to 49 years of age: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med.* 2007;146:511–5.
151. Anstey EH, Shoemaker ML, Barrera CM, et al.. Breastfeeding and breast cancer risk reduction: implications for black mothers. *Am J Prev Med.* 2017;53:S40–6.
152. Venetis K, Piciotti R, Sajjadi E, Invernizzi M, Morganti S, Criscitiello C, Fusco N. Breast Cancer with Bone Metastasis: Molecular Insights and Clinical Management. *Cells.* 2021 Jun 2;10(6):1377.
153. Hernandez YA, Gonzalez J, Garcia R, Aristizabal-Pach?n A. The Expression of Hsa-Mir-1225-5p Limits the Aggressive Biological Be-haviour of Luminal

Breast Cancer Cell Lines. *Microna*. 2024 Jan 9. doi: 10.2174/0122115366268128231201054005. Epub ahead of print. PMID: 38204280.

154. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* 2007; 449 (7163): 682-88.

155. Gulati R, Mitra T, Rajiv R, Rajan EJE, Pierret C, Enninga EAL, Janardhanan R. Exosomal microRNAs in breast cancer: towards theranostic applications. *Front Mol Biosci*. 2024 Feb 22;11:1330144.

156. Mohan Lal P, Hamza Siddiqui M, Soulat A, Mohan A, Tanush D, Tirath K, Raja S, Khuzzaim Khan M, Raja A, Chaulagain A, Tejwaney U. MicroRNAs as promising biomarkers and potential therapeutic agents in breast cancer management: a comprehensive review. *Ann Med Surg (Lond)*. 2024 Apr 22;86(6):3543-3550.

157. Subramanian K, Sinha R. Functions of Differentially Regulated miRNAs in Breast Cancer Progression: Potential Markers for Early Detection and Candidates for Therapy. *Biomedicines*. 2024 Mar 20;12(3):691.

158. de Miranda FS, Slaibi-Filho J, Calasans Dos Santos G, Carmo NT, Kaneto CM, Borin TF, Luiz WB, Gastalho Campos LC. MicroRNA as a promising molecular biomarker in the diagnosis of breast cancer. *Front Mol Biosci*. 2024 May 15;11:1337706.

159. Verma VK, Beevi SS, Nair RA, Kumar A, Kiran R, Alexander LE, Dinesh Kumar L. MicroRNA signatures differentiate types, grades, and stages of breast invasive ductal carcinoma (IDC): miRNA-target interacting signaling pathways. *Cell Commun Signal*. 2024 Feb 7;22(1):100.

160. Turkoglu F, Calisir A, Ozturk B. Clinical importance of serum miRNA levels in breast cancer patients. *Discov Oncol*. 2024 Jan 27;15(1):19.

161. Abdulhussain MM, Hasan NA, Hussain AG. Interrelation of the circulating and tissue MicroRNA-21 with tissue PDCD4 expression and the invasiveness of Iraqi female breast tumors. *Indian J Clin Biochem* 2019; 34 (1): 26-38.

162. Zheng SR, Guo GL, Zhai Q, et al. Effects of miR-155 antisense oligonucleotide on breast carcinoma cell line MDA-MB-157 and implanted tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14 (4): 2361-66.
163. Zhang CM, Zhao J, Deng HY. MiR-155 promotes proliferation of human breast cancer MCF-7 cells through targeting tumor protein 53-induced nuclear protein 1. *J Biomed Sci* 2013; 20 (1): 1-10.
164. Yu SJ, Hu JY, Kuang XY, et al. MicroRNA-200a promotes anoikis resistance and metastasis by targeting YAP1 in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19 (6): 1389-99.
165. Wang Y, Rathinam R, Walch A, et al. ST14 (Suppression of tumorigenicity 14) gene is a target for miR-27b, and the inhibitory effect of ST14 on cell growth is independent of miR-27b regulation. *J Biol Chem* 2009; 284 (34): 23094-106.
166. Zhang L, Du Y, Xu S, et al. DEPDC1, negatively regulated by miR-26b, facilitates cell proliferation via the up-regulation of FOXM1 expression in TNBC. *Cancer Lett* 2019; 442: 242-51.
167. Chen Y., Wu N., Liu L., Dong H., Liu X. microRNA-128-3p overexpression inhibits breast cancer stem cell characteristics through suppression of Wnt signalling pathway by down-regulating NEK2. *J. Cell. Mol. Med.* 2020;24:7353-7369. doi: 10.1111/jcmm.15317.
168. Lukianova N., Borikun T., Yalovenko T., Chekhun V. Role of mirna-122 and mirna-200b in intratumor heterogeneity formation and human breast cancer prognosis. *Int J Cur Res Rev.* 2016. 8 (17): 50 - 59.
169. Т.В. Борікун, В.М. Базась, Т.В. Задворний, Н.Ю. Лук'янова. Профіль експресії мікроРНК, асоційований з агресивністю перебігу раку молочної залози різних молекулярних підтипів. *Онкологія* 2022. 24 (2): 01 - 10.
170. Н.Ю. Лук'янова, Т.В. Борікун, Т.В. Задворний, Т.М. Яловенко, В.М. Базась, О.М. Ключов, Е.О. Стаховський, В.Ф.Чехун. Діагностичне та прогностичне значення пухлино-асоційованих мікроРНК 21, 125b та 221 у пацієнтів з найбільш розповсюдженими гормонозалежними злоякісними новоутвореннями. *Онкологія* 2021. 23 (3): 123 - 129.

171. Bakr N.M., Mahmoud M.S., Nabil R., Boushnak H., Swellam M. Impact of circulating MiRNA-373 on breast cancer diagnosis through targeting VEGF and cyclin D1 genes. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2021;19:84. doi: 10.1186/s43141-021-00174-7.
172. Kzar Al-Shukri HH, Abdul-Jabbar Ali S, Al-Akkam KA, Hjazi A, Rasulova I, Mustafa YF, Al-Saidi DN, Alasheqi MQ, Alawadi A, Alsaalamy A. The role of exo-miRNA in diagnosis and treatment of cancers, focusing on effective miRNAs in colorectal cancer. *Cell Biol Int.* 2024 Mar;48(3):280-289.
173. Kahraman M., R?ske A., Laufer T., Fehlmann T., Backes C., Kern F., Kohlhaas J., Schr?rs H., Saiz A., Zabler C., et al. MicroRNA in diagnosis and therapy monitoring of early-stage triple-negative breast cancer. *Sci. Rep.* 2018;8:11584.
174. Yin H, Xiong G, Guo S, Xu C, Xu R, Guo P, et al.. Delivery of Anti-Mirna for Triple-Negative Breast Cancer Therapy Using RNA Nanoparticles Targeting Stem Cell Marker CD133. *Mol Ther* (2019) 27:1252-61.
175. Ren Y, Wang R, Gao L, Li K, Zhou X, Guo H, et al.. Sequential Co-Delivery of Mir-21 Inhibitor Followed by Burst Release Doxorubicin Using NIR-Responsive Hollow Gold Nanoparticle to Enhance Anticancer Efficacy. *J Controlled Release* (2016) 228:74-86. 10.1016/j.jconrel.2016.03.008
176. Bahreyni A, Alibolandi M, Ramezani M, Sadeghi AS, Abnous K, Taghdisi SM. A Novel MUC1 Aptamer-Modified PLGA-Epirubicin-P Beta AE-Antimir-21 Nanocomplex Platform for Targeted Co-Delivery of Anticancer Agents in Vitro and in Vivo. *Colloids Surf B-Biointerf* (2019) 175:231-8. 10.
177. Devulapally R, Sekar NM, Sekar TV, Foygel K, Massoud TF, Willmann JK, et al.. Polymer Nanoparticles Mediated Codelivery of Antimir-10b and Antimir-21 for Achieving Triple Negative Breast Cancer Therapy. *ACS Nano* (2015) 9:2290-302. 10.1021/nn507465d
178. Conde J, Oliva N, Atilano M, Song HS, Artzi N. Self-Assembled RNA-Triple-Helix Hydrogel Scaffold for Microna Modulation in the Tumour Microenvironment. *Nat Mat* (2016) 15:353-63.

179. Chen C, Pan YD, Bai LP, Chen HL, Duan ZJ, Si Q, et al.. Microrna-3613-3p Functions as a Tumor Suppressor and Represents a Novel Therapeutic Target in Breast Cancer. *Breast Cancer Res* (2021) 23:12.
180. Jung E.J., Santarpia L., Kim J.-Y., Esteva F.J., Moretti E., Buzdar A.U., et al. Plasma microRNA 210 levels correlate with sensitivity to trastuzumab and tumor presence in breast cancer patients. *Cancer*. 2012;118.
181. Gao L, Medford A, Spring L, Bar Y, Hu B, Jimenez R, Isakoff SJ, Bardia A, Peppercorn J. Searching for the "Holy Grail" of breast cancer recurrence risk: a narrative review of the hunt for a better biomarker and the promise of circulating tumor DNA (ctDNA). *Breast Cancer Res Treat*. 2024 Feb 15. doi: 10.1007/s10549-024-07253-6. Epub ahead of print. PMID: 38355821.
182. De Schepper M, Nguyen HL, Richard F, Rosias L, Lerebours F, Vion R, Clatot F, Berghian A, Maetens M, Leduc S, Isnaldi E, Molinelli C, Lambertini M, Grillo F, Zoppoli G, Dirix L, Punie K, Wildiers H, Smeets A, Nevelsteen I, Neven P, Vincent-Salomon A, Larsimont D, Duhem C, Viens P, Bertucci F, Biganzoli E, Vermeulen P, Floris G, Desmedt C. Treatment Response, Tumor Infiltrating Lymphocytes and Clinical Outcomes in Inflammatory Breast Cancer-Treated with Neoadjuvant Systemic Therapy. *Cancer Res Commun*. 2024 Jan 24;4(1):186-199.
183. Tong L, Wang Y, Xu D, Wu Y, Chen L. Prevalence and Factors Contributing to Fear of Recurrence in Breast Cancer Patients and Their Partners: A Cross-Sectional Study. *Int J Womens Health*. 2024 Feb 5;16:229-236. doi: 10.2147/IJWH.S443681. PMID: 38344254; PMCID: PMC10854235.
184. Smolanka II, Movchan OV, Bagmut IY, Sheremet MI, Kolisnyk IL, Dosenko IV, Lyashcnko AO, Ivankova OM, Loboda AD, Shidlovskyi OV. Breast cancer relapses considering molecular biological characteristics. *J Med Life*. 2023 Jan;16(1):70-75.
185. Hartup SM, Morgan JL, Cheng VW, Barry PA, Copson E, Cutress RI, Dave R, Elsberger B, Fairbrother P, Hogan B, Horgan K, Kirwan CC, McIntosh SA, O'Connell RL, Patani N, Potter S, Rattay T, Sheehan L, Wyld L, Kim B. The MARECA (national study of management of breast cancer locoregional recurrence

and oncological outcomes) study: protocol for a prospective, multicentre cohort study. *Int J Surg Protoc*. 2024 Jan 26;28(1):20-26.

186. Chen H., Gao M., Zhang Y., Liang W., Zou X. Attention-based Multi-NMF deep neural network with multimodality data for breast cancer prognosis model. *BioMed Res. Int*. 2019;2019.

187. Wang Z., Li R., Wang M., Li A. GPDBN: deep bilinear network integrating both genomic data and pathological images for breast cancer prognosis prediction. *Bioinformatics*. 2021;37:2963-2970.

188. Pu T., Shen M., Li S., Yang L., Gao H., Xiao L., et al. Repression of miR-135b-5p promotes metastasis of early-stage breast cancer by regulating downstream target SDCBP. *Lab. Invest*. 2019;99(9):1296-1308.

189. Shu D, Shu Y, Haque F, Abdelmawla S, Guo P. Thermodynamically Stable RNA Three-Way Junction for Constructing Multifunctional Nanoparticles for Delivery of Therapeutics. *Nat Nanotechnol* (2011) 6:658-67.

190. Colombi M, J?z?quel P, Rubeaux M, Frenel J-S, Bigot F, Seegers V, et al.. The EPICURE Study: A Pilot Prospective Cohort Study of Heterogeneous and Massive Data Integration in Metastatic Breast Cancer Patients. *BMC Cancer* (2021) 21:333.

191. To KKW, Fong W, Tong CWS, Wu M, Yan W, Cho WCS. Advances in the Discovery of Microrna-Based Anticancer Therapeutics: Latest Tools and Developments. *Expert Opin Drug Discov* (2020) 15:63-83.

192. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G. Therapeutic Advances of Mirnas: A Preclinical and Clinical Update. *J Adv Res* (2020) 28:127-38.

193. Wang F, Zuroske T, Watts JK. RNA Therapeutics on the Rise. *Nat Rev Drug Discov* (2020) 19:441-2.

194. Ahram M, Abu Alragheb B, Abushukair H, Bawadi R, Al-Hussaini M. MicroRNAs Associated with Androgen Receptor and Metastasis in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024 Feb 4;16(3):665. doi: 10.3390/cancers16030665. PMID: 38339416; PMCID: PMC10854913.

195. Riaz F. New strategies for the management of triple-negative breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2024 Feb 1;36(1):40-44.
196. Cascione L., Gasparini P., Lovat F., Carasi S., Pulvirenti A., Ferro A., Alder H., He G., Vecchione A., Croce C.M., et al. Integrated microRNA and mRNA signatures associated with survival in triple negative breast cancer. *PLoS ONE.* 2013;8:e55910. doi: 10.1371/journal.pone.0055910.
197. Nakano K., Miki Y., Hata S., Ebata A., Takagi K., Mcnamara K.M., Sakurai M., Masuda M., Hirakawa H., Ishida T., et al. Identification of Androgen-responsive microRNAs and Androgen-related Genes in Breast Cancer. *Anticancer. Res.* 2013;33:4811-4819.
198. Ahram M., Mustafa E., Zaza R., Abu Hammad S., Alhudhud M., Bawadi R., Zihlif M. Differential expression and androgen regulation of microRNAs and metalloprotease 13 in breast cancer cells. *Cell Biol. Int.* 2017;41:1345-1355.
199. Al-Othman N., Hammad H., Ahram M. Dihydrotestosterone regulates expression of CD44 via miR-328-3p in triple-negative breast cancer cells. *Gene.* 2018;675:128-135.
200. Errani C. Treatment of Bone Metastasis. *Curr Oncol.* 2022 Jul 22;29(8):5195-5197. doi: 10.3390/curroncol29080411. PMID: 35892980; PMCID: PMC9331427.
201. Scimeca M. Bone Metastasis Challenge: New Ideas and Future. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 24;24(7):6161. doi: 10.3390/ijms24076161. PMID: 37047132; PMCID: PMC10093906.
202. Shen F, Huang J, Yang K, Sun C. A Comprehensive Review of Interventional Clinical Trials in Patients with Bone Metastases. *Onco Targets Ther.* 2023 Jun 29;16:485-495.
203. Hara H, Sakai Y et al. Surgical outcomes of metastatic bone tumors in the extremities (Surgical outcomes of bone metastases). *J Bone Oncol.* 2021 Feb 19;27:100352.
204. Christ AB, Piple AS, Gettleman BS, Duong A, Chen M, Wang JC, Heckmann ND, Menendez L. Prevalence of primary malignant tumours, rates of

pathological fracture, and mortality in the setting of metastatic bone disease. *Bone Jt Open*. 2023 Jun 5;4(6):424-431.

205. Chekhun V., Martynyuk O., Lukianova Y., Mushii O., Zadvornyi T., Lukianova N. (2023). Features of breast cancer in patients of young age: search for diagnosis optimization and personalized treatment. *Experimental Oncology*, 45(2), 139-150.

206. Bocchi MB, Meschini C, Pietramala S, Perna A, Oliva MS, Matrangelo MR, Ziranu A, Maccauro G, Vitiello R. Electrochemotherapy in the Treatment of Bone Metastases: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2023 Sep 23;12(19):6150.

207. D'Oronzo S, Coleman R, Brown J, Silvestris F. Metastatic bone disease: Pathogenesis and therapeutic options: Up-date on bone metastasis management. *J Bone Oncol*. 2018 Nov 6;15:004-4. doi: 10.1016/j.jbo.2018.10.004. PMID: 30937279; PMCID: PMC6429006.

208. Mohammadi M, Fazilat A, Mamalo AS, Ojarudi M, Hemmati-Dinarvand M, Beilankouhi EAV, Valilo M. Correlation of PTEN signaling pathway and miRNA in breast cancer. *Mol Biol Rep*. 2024 Jan 28;51(1):221. doi: 10.1007/s11033-023-09191-w. PMID: 38281224.

209. Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson EG, et al.. Therapeutic Silencing of Mir-10b Inhibits Metastasis in a Mouse Mammary Tumor Model. *Nat Biotechnol* (2010) 28:341-U67.

210. Yoo B, Kavishwar A, Wang P, Ross A, Pantazopoulos P, Dudley M, et al.. Therapy Targeted to the Metastatic Niche is Effective in a Model of Stage IV Breast Cancer. *Sci Rep* (2017) 7:45060.

211. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics*. 2015 Jul 13;5(10):1122-43. doi: 10.7150/thno.11543. PMID: 26199650; PMCID: PMC4508501.

212. Zhang QY, Ran R, Zhang L, Liu YY, Mei L, Zhang ZR, et al.. Simultaneous Delivery of Therapeutic Antagomirs With Paclitaxel for the Management of

Metastatic Tumors by a Ph-Responsive Anti-Microbial Peptide-Mediated Liposomal Delivery System. *J Controlled Release* (2015) 197:208-18.

213. Dettori D, Orso F, Penna E, Baruffaldi D, Brundu S, Maione F, et al.. Therapeutic Silencing of Mir-214 Inhibits Tumor Progression in Multiple Mouse Models. *Mol Ther* (2018) 26:2008-18.

214. Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, Williams LM, Engelberth DJ, Guirao K, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow. *Cancer Res* (2016) 76:5832-44.

215. De Cola A, Lamolinara A, Lanuti P, Rossi C, Iezzi M, Marchisio M, et al.. Mir-205-5p Inhibition by Locked Nucleic Acids Impairs Metastatic Potential of Breast Cancer Cells. *Cell Death Dis* (2018) 8:821.

216. Wang W, Liu Y, Guo J, He H, Mi X, Chen C, et al.. Mir-100 Maintains Phenotype of Tumor-Associated Macrophages by Targeting Mtor to Promote Tumor Metastasis Via Stat5a/IL-1ra Pathway in Mouse Breast Cancer. *Oncogenesis* (2018) 8:97.

217. Zhao Z, Li L, Du P, Ma L, Zhang W, Zheng L, et al.. Transcriptional Downregulation of Mir-4306 Serves as a New Therapeutic Target for Triple Negative Breast Cancer. *Theranostics* (2019) 9:1401-16.

218. Ramchandani D, Lee SK, Yomtoubian S, Han MS, Tung C-H, Mittall V. Nanoparticle Delivery of Mir-708 Mimetic Impairs Breast Cancer Metastasis. *Mol Cancer Ther* (2019) 18:579-91. 1

219. Xu J, Sun J, Ho PY, Luo Z, Ma W, Zhao W, et al.. Creatine Based Polymer for Codelivery of Bioengineered Microrna and Chemodrugs Against Breast Cancer Lung Metastasis. *Biomaterials* (2019) 210:25-40.

220. Ribas A, Wolchok JD. Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade. *Science* (2018) 359:1350-5.

221. Mavratzas A, Seitz J, Smetanay K, Schneeweiss A, Jaeger D, Fremd C. Atezolizumab for Use in PD-L1-Positive Unresectable, Locally Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Future Oncol* (2020) 16:4439-53.

222. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al.. Atezolizumab Plus Nab-Paclitaxel as First-Line Treatment for Unresectable, Locally Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer (Impassion130): Updated Efficacy Results From a Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol* (2020) 21:44-59.
223. Kwapisz D. Pembrolizumab and Atezolizumab in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Immunol Immunother* (2021) 70:607-17.
224. Twomey JD, Zhang B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *AAPS J* (2021) 23:39-.
225. Abdallah M, Aziz IH, Alsammarraie AZ. Assessment of miRNA-10b Expression Levels as a Potential Precursor to Metastasis in Localized and Locally Advanced/Metastatic Breast Cancer among Iraqi Patients. *Int J Breast Cancer*. 2024 Feb 28;2024:2408355.
226. Gulati R, Mitra T, Rajiv R, Rajan EJE, Pierret C, Enninga EAL, Janardhanan R. Exosomal microRNAs in breast cancer: towards theranostic applications. *Front Mol Biosci*. 2024 Feb 22;11:1330144.
227. Li L, Zhang Y, Yang K, Liu W, Zhou Z, Xu Y. miRNA-449c-5p regulates the JAK-STAT pathway in inhibiting cell proliferation and invasion in human breast cancer cells by targeting ERBB2. *Cancer Rep (Hoboken)*. 2024 Feb;7(2):e1974.
228. Gao L, Guo Q, Li X, Yang X, Ni H, Wang T, et al.. Mir-873/PD-L1 Axis Regulates the Stemness of Breast Cancer Cells. *Ebiomedicine* (2019) 41:395-407.
229. Turkoglu F, Calisir A, Ozturk B. Clinical importance of serum miRNA levels in breast cancer patients. *Discov Oncol*. 2024 Jan 27;15(1):19. doi: 10.1007/s12672-024-00871-y. PMID: 38280134; PMCID: PMC10821853.
230. Lee SH, Brianna. Association of microRNA-21 expression with breast cancer subtypes and its potential as an early biomarker. *Pathol Res Pract*. 2024 Feb;254:155073. doi: 10.1016/j.prp.2023.155073. Epub 2024 Jan 3. PMID: 38218039.

231. Wu X, Ding M, Lin J. Three-microRNA expression signature predicts survival in triple-negative breast cancer. *Oncol Lett*. 2020 Jan;19(1):301-308. doi: 10.3892/ol.2019.11118. Epub 2019 Nov 19. PMID: 31897142; PMCID: PMC6923981.
232. Papadaki C., Stoupis G., Tsalikis L., Monastirioti A., Papadaki M., Maliotis N., Stratigos M., Mastrostamatis G., Mavroudis D., Agelaki S., et al. Circulating miRNAs as a marker of metastatic disease and prognostic factor in metastatic breast cancer. *Oncotarget*. 2019;10:966-981. doi: 10.18632/oncotarget.26629.
233. Jang J.Y., Kim Y.S., Kang K.N., Kim K.H., Park Y.J., Kim C.W. Multiple microRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis. *Mol. Clin. Oncol*. 2021;14:31. doi: 10.3892/mco.2020.2193.
234. Tsai HP, Huang SF, Li CF, Chien HT, Chen SC. Differential microRNA expression in breast cancer with different onset age. *PLoS One*. 2018 Jan 11;13(1):e0191195. doi: 10.1371/journal.pone.0191195. PMID: 29324832; PMCID: PMC5764434.
235. Toyama T, Kondo N, Endo Y, Sugiura H, Yoshimoto N, Iwasa M, Takahashi S, Fujii Y, Yamashita H. High expression of microRNA-210 is an independent factor indicating a poor prognosis in Japanese triple-negative breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Apr;42(4):256-63. doi: 10.1093/jjco/hys001. Epub 2012 Feb 9. PMID: 22323552.
236. Mohamed AA, Allam AE, Aref AM, Mahmoud MO, Eldesoky NA, Fawazy N, Sakr Y, Sobeih ME, Albogami S, Fayad E, Althobaiti F, Jafri I, Alsharif G, El-Sayed M, Abdelgeliel AS, Abdel Aziz RS. Evaluation of Expressed MicroRNAs as Prospective Biomarkers for Detection of Breast Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Mar 23;12(4):789. doi: 10.3390/diagnostics12040789. PMID: 35453838; PMCID: PMC9026478.
237. Yamashita H, Iwase H, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Yoshimoto N, Endo Y, Fujii Y, Kobayashi S. Estrogen receptor-positive breast cancer in Japanese women: trends in incidence, characteristics, and prognosis. *Ann Oncol*.

- 2011 Jun;22(6):1318-1325. doi: 10.1093/annonc/mdq596. Epub 2010 Nov 30. PMID: 21119029.
238. Pela-Chilet M, Mart?nez MT, Pirez-Fidalgo JA, Peire-Chova L, Oltra SS, Tormo E, Alonso-Yuste E, Martinez-Delgado B, Eroles P, Climent J, Burgu?s O, Ferrer-Lozano J, Bosch A, Lluch A, Ribas G. MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC Cancer*. 2014 Jul 21;14:529. doi: 10.1186/1471-2407-14-529. PMID: 25047087; PMCID: PMC4223555.
239. Rivera-Franco MM, Leon-Rodriguez E. Delays in Breast Cancer Detection and Treatment in Developing Countries. *Breast Cancer (Auckl)*. 2018 Jan 8;12:1178223417752677. doi: 10.1177/1178223417752677. Erratum in: *Breast Cancer (Auckl)*. 2019 Mar 11;13:1178223419834790. PMID: 29434475; PMCID: PMC5802601.
240. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. *Lancet Oncol*. 2012 Nov;13(11):1141-51. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70425-4. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23084519; PMCID: PMC3488186.
241. Pashayan N, Antoniou AC, Ivanus U, Esserman LJ, Easton DF, French D, Sroczynski G, Hall P, Cuzick J, Evans DG, Simard J, Garcia-Closas M, Schmutzler R, Wegwarth O, Pharoah P, Moorthie S, De Montgolfier S, Baron C, Herceg Z, Turnbull C, Balleyguier C, Rossi PG, Wesseling J, Ritchie D, Tischkowitz M, Broeders M, Reisel D, Metspalu A, Callender T, de Koning H, Devilee P, Delaloge S, Schmidt MK, Widschwendter M. Personalized early detection and prevention of breast cancer: ENVISION consensus statement. *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Nov;17(11):687-705. doi: 10.1038/s41571-020-0388-9. Epub 2020 Jun 18. Erratum in: *Nat Rev Clin Oncol*. 2020 Jun 29;; PMID: 32555420; PMCID: PMC7567644.
242. Gupta GK, Collier AL, Lee D, Hoefer RA, Zheleva V, Siewerts van Reesema LL, Tang-Tan AM, Guye ML, Chang DZ, Winston JS, Samli B, Jansen RJ, Petricoin EF, Goetz MP, Bear HD, Tang AH. Perspectives on Triple-Negative

Breast Cancer: Current Treatment Strategies, Unmet Needs, and Potential Targets for Future Therapies. *Cancers (Basel)*. 2020 Aug 24;12(9):2392.

243. Mohamed AA, Allam AE, Aref AM, Mahmoud MO, Eldesoky NA, Fawazy N, Sakr Y, Sobeih ME, Albogami S, Fayad E, Althobaiti F, Jafri I, Alsharif G, El-Sayed M, Abdelgeliel AS, Abdel Aziz RS. Evaluation of Expressed MicroRNAs as Prospective Biomarkers for Detection of Breast Cancer. *Diagnostics (Basel)*. 2022 Mar 23;12(4):789. doi: 10.3390/diagnostics12040789. PMID: 35453838; PMCID: PMC9026478.

244. Hamam R, et al. Circulating microRNAs in breast cancer: novel diagnostic and prognostic biomarkers. *Cell Death Dis*. 2017;8(9):e3045. doi: 10.1038/cddis.2017.440.

245. Cui M, et al. Circulating MicroRNAs in cancer: potential and challenge. *Front Genet*. 2019;10:626.

246. Kong W, et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 2014;33(6):679-689

247. Singh T, Kaushik M, Mishra LC, Behl C, Singh V, Tuli HS. Exosomal miRNAs as novel avenues for breast cancer treatment. *Front Genet*. 2023 Mar 22;14:1134779. doi: 10.3389/fgene.2023.1134779. PMID: 37035739; PMCID: PMC10073516.

248. Ng EKO Li R Shin VY Jin HC Leung CPH Circulating microRNAs as specific biomarkers for breast cancer detection. *Public Library of Science One* . 2013;8.

249. Sueta, A., Yamamoto, Y., Tomiguchi, M., Takeshita, T., Yamamoto-Ibusuki, M., & Iwase, H. (2017). Differential expression of exosomal miRNAs between breast cancer patients with and without recurrence. *Oncotarget*, 8(41), 69934-69944. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19482>

250. Song B, Wang C, Liu J, Wang X, Lv L, Wei L, Xie L, Zheng Y, Song X. MicroRNA-21 regulates breast cancer invasion partly by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase 3 expression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:29.

251. Christodoulatos GS, Dalamaga M. Micro-RNAs as clinical biomarkers and therapeutic targets in breast cancer: Quo vadis?. *World J Clin Oncol*. 2014;5(2):71-81. doi:10.5306/wjco.v5.i2.71
252. Biagioni F, Bossel Ben-Moshe N, Fontemaggi G, Yarden Y, Domany E, Blandino G. The locus of microRNA-10b: a critical target for breast cancer insurgence and dissemination. *Cell Cycle*. 2013 Aug 1;12(15):2371-5. doi: 10.4161/cc.25380. Epub 2013 Jun 26. PMID: 23839045; PMCID: PMC3841316.
253. Petri BJ, Klinge CM. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs. *Cancer Metastasis Rev*. 2020 Sep;39(3):837-886. doi: 10.1007/s10555-020-09905-7. PMID: 32577859; PMCID: PMC7487050.
254. Cardinali B, Tasso R, Piccioli P, Ciferri MC, Quarto R, Del Mastro L. Circulating miRNAs in Breast Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancers (Basel)*. 2022 May 7;14(9):2317. doi: 10.3390/cancers14092317. PMID: 35565446; PMCID: PMC9101355.
255. Loh HY, Norman BP, Lai KS, Rahman NMANA, Alitheen NBM, Osman MA. The Regulatory Role of MicroRNAs in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 6;20(19):4940. doi: 10.3390/ijms20194940. PMID: 31590453; PMCID: PMC6801796.
256. Garrido-Cano I, Pattanayak B, Adam-Artigues A, Lameirinhas A, Torres-Ruiz S, Tormo E, Cervera R, Eroles P. MicroRNAs as a clue to overcome breast cancer treatment resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 2022 Mar;41(1):77-105. doi: 10.1007/s10555-021-09992-0. Epub 2021 Sep 15. PMID: 34524579; PMCID: PMC8924146.
257. Biagioni F, Bossel Ben-Moshe N, Fontemaggi G, Canu V, Mori F, Antoniani B, Di Benedetto A, Santoro R, Germoni S, De Angelis F, Cambria A, Avraham R, Grasso G, Strano S, Muti P, Mottolese M, Yarden Y, Domany E, Blandino G. miR-10b*, a master inhibitor of the cell cycle, is down-regulated in human breast tumours. *EMBO Mol Med*. 2012 Nov;4(11):1214-29. doi: 10.1002/emmm.201201483. PMID: 23125021; PMCID: PMC3494877.

258. Davey MG, Davies M, Lowery AJ, Miller N, Kerin MJ. The Role of MicroRNA as Clinical Biomarkers for Breast Cancer Surgery and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2021 Aug 1;22(15):8290. doi: 10.3390/ijms22158290. PMID: 34361056; PMCID: PMC8346977.
259. Jin, Y., Wei, J., Xu, S., Guan, F., Yin, L., & Zhu, H. (2019). miR-210-3p regulates cell growth and affects cisplatin sensitivity in human ovarian cancer cells via targeting E2F3. *Molecular Medicine Reports*, 19, 4946-4954. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10129>
260. Nilsson R, Jain M, Madhusudhan N, et al. Metabolic enzyme expression highlights a key role for MTHFD2 and the mitochondrial folate pathway in cancer. *Nat Commun.* 2014;5:3128. doi:10.1038/ncomms4128
261. Al-Othman N., Hammad H., Ahram M. Type of Serum as a Cell Culture Supplement Influences Regulation of MicroRNA Expression in Breast MDA-MB-231 Cancer Cells. *Jordan Med. J.* 2017;51:1-7.
262. Petrović N., Todorović L., Nedeljković M., Božović A., Bukumirić Z., Tanić N.D., Jovanović-Supić S., Šamić A., Mandušić V. Dual function miR-205 is positively associated with ER and negatively with five-year survival in breast cancer patients. *Pathol. Res. Pract.* 2022;238:154080.
263. Sempere L. F., Keto J., Fabbri M. (2017). Exosomal microRNAs in breast cancer towards diagnostic and therapeutic applications. *Cancers* 9 (7), 71. 10.3390/cancers9070071
264. Shen R., Wang Y., Wang C. X., Yin M., Liu H. L., Chen J. P., et al. (2015). MiRNA-155 mediates TAM resistance by modulating SOCS6-STAT3 signalling pathway in breast cancer. *Am. J. Transl. Res.* 7 (10), 2115-2126.
265. Xiao Y., Li Y., Tao H., Humphries B., Li A., Jiang Y., Yang C., Luo R., Wang Z. Integrin $\alpha 5$ down-regulation by miR-205 suppresses triple negative breast cancer stemness and metastasis by inhibiting the Src/Vav2/Rac1 pathway. *Cancer Lett.* 2018;433:199-209.

266. Menon A, Abd-Aziz N, Khalid K, Poh CL, Naidu R. miRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022 Sep 29;23(19):11502. doi: 10.3390/ijms231911502. PMID: 36232799; PMCID: PMC9569513.
267. Vo TH, El-Sherbieny Abdelaal E, Jordan E, O'Donovan O, McNeela EA, Mehta JP, Rani S. miRNAs as biomarkers of therapeutic response to HER2-targeted treatment in breast cancer: A systematic review. *Biochem Biophys Rep.* 2023 Nov 28;37:101588.
268. Baclic, M. (2024). Utilization of Artificial Intelligence in Breast Pathology: An Overview. *PJP*, 9(1), 6–10.
269. Sacca L, Lobaina D, Burgoa S, Lotharius K, Moothedan E, Gilmore N, Xie J, Mohler R, Scharf G, Knecht M, Kitsantas P. Promoting Artificial Intelligence for Global Breast Cancer Risk Prediction and Screening in Adult Women: A Scoping Review. *J Clin Med.* 2024 Apr 25;13(9):2525.
270. Yahya SMM, Nabih HK, Elsayed GH, Mohamed SIA, Elfiky AM, Salem SM. Restoring microRNA-34a overcomes acquired drug resistance and disease progression in human breast cancer cell lines via suppressing the ABCC1 gene. *Breast Cancer Res Treat.* 2024 Feb;204(1):133-149.
271. Dziechciowska I, Dębrowska M, Mizielska A, Pyra N, Lisiak N, Kopczyński P, Jankowska-Wajda M, Rubińska B. miRNA Expression Profiling in Human Breast Cancer Diagnostics and Therapy. *Curr Issues Mol Biol.* 2023 Nov 25;45(12):9500-9525.
272. Harashchenko O, Antonov V, Konovalenko V. Support tool for decision making in selecting chemotherapy tactics for treatment of breast cancer patients. *G Med News.* 2019; 6 (291): 20–25.
273. Chekhun V.F., Borikun T.V., Bazas V., Andriiv A.V., Klyusov O., Yalovenko T., Lukianova N.Y. Association of Circulating MiR-21, -205, and -182 with Response of Luminal Breast Cancers to Neoadjuvant FAC and AC Treatment. *Exp. Oncol.* 2020;42:162–166.

274. Cardinali B, Tasso R, Piccioli P, Ciferri MC, Quarto R, Del Mastro L. Circulating miRNAs in Breast Cancer Diagnosis and Prognosis. *Cancers (Basel)*. 2022 May 7;14(9):2317.
275. Manoj Gowda S, Kabeer KK, Jafferbhoy S, et al. Breast cancer management guidelines during COVID-19 pandemic. *Indian J Surg* 2020; 1–8.
276. Parise R, Li YE, Nadar RM, Ramesh S, Ren J, Govindarajulu MY, Moore T, Dhanasekaran M. Health influence of SARS-CoV-2 (COVID-19) on cancer: a review. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2022 Oct 25;54(10):1395-1405.
277. Tasoulis MK, Roche N, MacNeill F. Rationalizing breast cancer surgery during the COVID-19 pandemic. *Eur J Surg Oncol* 2020; 46 (6): 1192–93
278. Yang J, Jiang W. A meta-analysis of the association between post-traumatic stress disorder and cancer risk. *Front Psychiatry*. 2023 Oct 30;14:1281606. doi: 10.3389/fpsyt.2023.1281606. PMID: 37965365; PMCID: PMC10642749.
279. Apple S.K., Suthar F. How do we measure a residual tumor size in histopathology (the gold standard) after neoadjuvant chemotherapy? *Breast* 2006;15(1):370–6.
280. Гаращенко О.О. Рівень плазмових міРНК у хворих на рак молочної залози та їх кореляція з клінічною картиною пацієнтів як показник для індивідуалізованого лікування. *Клінічна онкологія*. 2024; 14(1): 1-7. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.53-1.31750
281. O. Harashchenko. Assessment of circulating miRNA levels in breast cancer patients depending on clinical characteristics and chemotherapy. *Exp Oncol*. 2023; 45(4): 451-456. DOI: 10.15407/exp-oncology.2023.04.451
282. Konovalenko, V., Drobotun, O., Ternovyy, N. Konovalenko, S., Garashchenko, O. Monitoring and personalization in treatment of breast cancer patients with metastatic bone lesions. *Eureka: Health Sciences*: 2022; 1: 37-48.
283. Harashchenko O.O, Konovalenko V.F. Analysis of plasma MirNA-497 levels in the blood of patients with breast cancer. *Georgian Med News*. 2023; 7(340): 212-216.

284. О. О. Гаращенко, В. К. Антонов, В. Ф. Коноваленко. Система підтримки прийняття рішень при виборі тактики хіміотерапії хворих на рак грудної залози. Тези доповіді на конференції «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоніфікованої терапії раку» (3–4 жовтня 2019 р., Київ): 78-79.

Додаток А

Список публікацій здобувача

1. Гаращенко О.О. Рівень плазмових міРНК у хворих на рак молочної залози та їх кореляція з клінічною картиною пацієнтів як показник для індивідуалізованого лікування. Клінічна онкологія. 2024; 14(1): 1-7. DOI: 10.32471/clinicaloncology.2663-466X.53-1.31750
2. O. Harashchenko. Assessment of circulating miRNA levels in breast cancer patients depending on clinical characteristics and chemotherapy. Exp Oncol. 2023; 45(4): 451-456. DOI: 10.15407/exp-oncology.2023.04.451
3. Harashchenko O, Antonov V., Konovalenko V. Support tool for decision-making in selecting chemotherapy tactics for treatment of breast cancer patients. Georgian Med News. 2019; 6(291): 20-25.
4. В.Ф. Коноваленко, О.О. Гаращенко, С.В. Коноваленко. Сучасні підходи до діагностики і лікування хворих на рак молочної залози. Онкологія. 2021; 23(1): 1-9.
5. Konovalenko, V., Drobotun, O., Ternovyy, N. Konovalenko, S., Garashchenko, O. Monitoring and personalization in treatment of breast cancer patients with metastatic bone lesions. Eureka: Health Sciences: 2022; 1: 37-48.
6. Harashchenko O.O, Konovalenko V.F. Analysis of plasma MirNA-497 levels in the blood of patients with breast cancer. Georgian Med News. 2023; 7(340): 212-216.
7. О. О. Гаращенко, В. К. Антонов, В. Ф. Коноваленко. Система підтримки прийняття рішень при виборі тактики хіміотерапії хворих на рак грудної залози. Тези доповіді на конференції «Інноваційні технології скринінгу, діагностики та персоніфікованої терапії раку» (3–4 жовтня 2019 р., Київ): 78-79.

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. XIV з'їзд онкологів та радіологів України (Київ, 2021) - постерна доповідь.
2. Conference "International scientific integration '2023" (Сієтл, США) – тези.