

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

**МАРТИНЮК ОЛЕНА МИХАЙЛІВНА**

УДК 577.2:616-006, 616-085; 615

**ДИСЕРТАЦІЯ**

**ПРОГНОСТИЧНЕ ТА ПРЕДИКТИВНЕ ЗНАЧЕННЯ CXCL13 ПРИ РАКУ  
ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ У ПАЦІЄНТОК МОЛОДОГО ВІКУ**

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

\_\_\_\_\_ О.М. Мартинюк

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

Київ – 2026

## АНОТАЦІЯ

*Мартинюк О.М.* Прогностичне та предиктивне значення CXCL13 при раку грудної залози у пацієнок молодого віку

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я» зі спеціальності 222 «Медицина» (онкологія) – Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, 2026.

Метою дослідження було обґрунтувати доцільність використання показників експресії CXCL13 для оцінки агресивності перебігу та прогнозування ефективності неoad'ювантної поліхіміотерапії у хворих на рак грудної залози молодого віку.

Рак грудної залози (РГЗ) залишається найбільш поширеним злоякісним новоутворенням серед жінок у світі та однією з провідних причин онкологічної смертності. За даними GLOBOCAN, щорічно реєструється понад 2,3 млн нових випадків РМЗ, що становить близько 24,5% усіх злоякісних новоутворень у жінок. Особливу клінічну проблему становить РГЗ у жінок молодого віку, частка якого сягає 7–10% усіх випадків захворювання. Відомо, що РГЗ у молодих пацієнок характеризується більш агресивним перебігом, високою частотою низькодиференційованих пухлин, підвищеною проліферативною активністю та гіршими показниками виживаності порівняно з хворими старших вікових груп.

Неoad'ювантна поліхіміотерапія (НПХТ) є стандартом лікування локально-поширеного та біологічно агресивного РГЗ, оскільки дозволяє зменшити розміри пухлини, підвищити частоту органозберігаючих операцій та оцінити чутливість пухлини до системної терапії *in vivo*. Водночас приблизно у 30–50% пацієнок повна патологічна відповідь не досягається, що суттєво погіршує прогноз захворювання. Відсутність надійних молекулярних маркерів, здатних прогнозувати чутливість пухлин до НПХТ, зумовлює необхідність пошуку нових предиктивних та прогностичних біомаркерів, особливо для когорти хворих молодого віку.

Останніми роками значну увагу приділяють ролі пухлинного мікрооточення у формуванні чутливості до терапії. Показано, що інфільтрація пухлини імунокомпетентними клітинами, зокрема В-лімфоцитами та формування третинних лімфоїдних структур, асоціюється з кращою відповіддю на системне лікування та покращенням виживаності пацієнок з РГЗ. Одним із ключових хемокінів, залучених до рекрутування В-клітин у пухлинне мікрооточення, є CXCL13. Встановлено, що підвищена експресія CXCL13 у пухлинній тканині корелює з інтенсивною імунною інфільтрацією, підвищеною ефективністю хіміотерапії та сприятливішим прогнозом перебігу РГЗ. Разом з тим механізми регуляції експресії CXCL13 у пухлинній тканині залишаються недостатньо вивченими.

Відомо, що важливу роль у посттранскрипційній регуляції експресії генів відіграють мікроРНК — короткі некодуючі РНК, які контролюють експресію значної частини геному людини та залучені до регуляції проліферації, апоптозу, ангіогенезу та протипухлинного імунітету. Порушення експресії мікроРНК розглядається як один із ключових механізмів пухлинної прогресії та формування лікарської резистентності. Проте роль мікроРНК, залучених у регуляцію CXCL13 та імунної інфільтрації пухлин РГЗ у молодих пацієнок, практично не досліджена.

Для досягнення поставленої мети дослідження робота виконувалася поетапно із застосуванням клінічних, морфологічних, молекулярно-біологічних та біоінформатичних підходів, що дозволило комплексно охарактеризувати особливості перебігу РГЗ у пацієнок молодого віку та оцінити потенціал CXCL13 і пов'язаних з ним регуляторних мікроРНК як прогностичних і предиктивних біомаркерів.

На першому етапі роботи проведено комплексний аналіз клініко-морфологічних характеристик пухлинного процесу у хворих на РГЗ різних вікових груп, у результаті чого продемонстровано наявність суттєвих вікових відмінностей перебігу захворювання. У дослідження включено 544 хворих на РГЗ, які проходили лікування в Національному інституті раку у 2021–2024 рр.

Проведено порівняльний аналіз перебігу захворювання у пацієнок молодого віку та старшої вікової групи залежно від молекулярного підтипу пухлини. Зокрема, проаналізовано дані 76 жінок віком до 40 років і 97 пацієнок старших за 55 років із люмінальним А підтипом, 108 та 101 відповідно — із люмінальним В підтипом, 33 та 56 — із HER2/neu-позитивним підтипом, а також 27 і 56 пацієнок відповідних вікових груп із потрійно негативним РГЗ. Усі хворі отримували стандартизовану неоад'ювантну поліхіміотерапію за схемою AC (доксорубіцин 60 мг/м<sup>2</sup> і циклофосфамід 600 мг/м<sup>2</sup> кожні 14 днів) з подальшим щотижневим введенням паклітакселу 80 мг/м<sup>2</sup>. Оцінку ефективності лікування проводили за даними комп'ютерної томографії відповідно до критеріїв RECIST 1.1 до початку та після завершення передопераційного лікування, а ступінь лікувального патоморфозу пухлини визначали за шкалою Miller-Payne.

Показано, що пухлини люмінального Б молекулярного підтипу у пацієнок молодого віку характеризуються більш агресивними клінічними ознаками, відмінностями проліферативної активності, частоти метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів та особливостями відповіді на неоад'ювантну поліхіміотерапію. Отримані результати довели доцільність пошуку молекулярних маркерів, здатних відображати біологічні особливості новоутворень у цієї категорії хворих і підвищити точність прогнозування ефективності лікування.

У подальшому в системі *in silico* досліджено експресію CXCL13 у пухлинній тканині РГЗ на рівні мРНК. У результаті проведеного біоінформатичного аналізу показано, що експресія CXCL13 асоціюється з клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу, молекулярними підтипами РГЗ та показниками виживаності пацієнок. Продемонстровано зв'язок рівнів експресії CXCL13 з ефективністю неоад'ювантної антрациклін-вмісної поліхіміотерапії, що підтвердило перспективність цього хемокину як компонента молекулярної стратифікації хворих.

Наступним етапом виконано імуногістохімічне дослідження експресії CXCL13 у пухлинній тканині *ex vivo*. У проспективну частину дослідження

включено 120 жінок, хворих на РГЗ II–III стадій, які проходили лікування на базі Національного інституту раку МОЗ України. Усі пацієнтки надали інформовану згоду на участь у дослідженні та використання клінічних даних у наукових цілях. У межах стандартного клінічного обстеження, виконаного відповідно до чинних наказів МОЗ України та міжнародних діагностичних рекомендацій, усім хворим проведено комплексну оцінку загального клінічного та біохімічного статусу, інструментальні методи візуалізації (УЗД органів черевної порожнини, мамографію, рентгенографію органів грудної порожнини), а також морфологічну верифікацію пухлини шляхом пункційної біопсії. Стадіювання пухлинного процесу здійснювали згідно з TNM-класифікацією (8-е видання). Біопсійний матеріал пухлинної тканини а також зразки крові отримували до початку неoad'ювантної поліхіміотерапії. Усі пацієнтки отримували стандартизоване лікування за схемою AC (доксорубіцин 60 мг/м<sup>2</sup> та циклофосфамід 600 мг/м<sup>2</sup> кожні 21 день, 4 цикли) з подальшим хірургічним втручанням у вигляді органозберігаючих операцій або радикальної мастектомії за Мадденом відповідно до клінічних показань. Ефективність неoad'ювантної терапії оцінювали в динаміці кожні 2 цикли за даними мамографії відповідно до критеріїв RECIST 1.1, а ступінь лікувального патоморфозу пухлини визначали за шкалою Miller–Payne.

У результаті проведеного аналізу продемонстровано наявність CXCL13-позитивних клітин у пухлинному мікрооточенні та показано їх зв'язок із клініко-морфологічними характеристиками новоутворень. Доведено, що кількість CXCL13-позитивних клітин відрізняється залежно від віку пацієнток, молекулярного підтипу пухлин і ефективності неoad'ювантної поліхіміотерапії. Отримані результати підтвердили клінічну значущість CXCL13 як маркера, що відображає біологічні особливості пухлинного мікрооточення.

З використанням біоінформатичних підходів ідентифіковано мікроРНК, потенційно залучені до регуляції експресії гена *CXCL13*. У результаті проведеного *in silico* аналізу показано, що мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p є перспективними кандидатами на роль регуляторів *CXCL13* та можуть мати

клінічну значущість при РГЗ. В системі *in silico* продемонстровано асоціацію рівнів експресії зазначених мікроРНК із клінічними характеристиками захворювання та показниками виживаності пацієнток, що обґрунтовує доцільність їх подальшого експериментального вивчення.

Подальше дослідження виконано на клінічному матеріалі у системі *ex vivo*. У результаті аналізу експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у пухлинній тканині продемонстровано наявність вікових особливостей їх регуляції. Показано, що пухлини хворих молодого віку характеризуються специфічним профілем експресії досліджуваних мікроРНК. Доведено зв'язок рівнів експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p з клініко-морфологічними характеристиками пухлинного процесу, стадією захворювання, статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів та молекулярними підтипами РГЗ.

Окрему увагу приділено оцінці предиктивної значущості досліджуваних мікроРНК. У результаті проведеного аналізу продемонстровано зв'язок рівнів експресії мікроРНК-186-5p з чутливістю новоутворень до неoad'ювантної поліхіміотерапії. Показано, що зміни експресії досліджуваних мікроРНК можуть відображати формування резистентності пухлин до антрациклін-вмісних схем лікування.

Таким чином, проведене дослідження дозволило комплексно охарактеризувати роль CXCL13 та пов'язаних з ним мікроРНК у біології РГЗ у пацієнток молодого віку. Узагальнення отриманих результатів свідчить, що поєднане використання показників експресії CXCL13 та регуляторних мікроРНК створює підґрунтя для розробки нових підходів до прогнозування перебігу захворювання та персоналізації лікування хворих на РГЗ.

Ключові слова: рак грудної залози, аденокарцинома, пухлина, хворі молодого віку, молекулярний підтип, CXCL13, мікроРНК-26b-5p, мікроРНК-181-5p, персоналізація терапії, перебіг захворювання, виживаність, прогноз, неoad'ювантна поліхіміотерапія, опромінення, доксорубіцин, резистентність, метастази.

## SUMMARY

*Martyniuk O.M.* Assessment of the prognostic and predictive value of CXCL13 in breast cancer in young patients.

Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 “Health Care” in specialty 222 “Medicine” (Oncology) – R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Kyiv, 2026.

The aim of the study was to substantiate the feasibility of using CXCL13 expression indicators to assess the aggressiveness of the disease course and to predict the effectiveness of neoadjuvant polychemotherapy in young breast cancer patients.

Breast cancer (BC) remains the most common malignant neoplasm among women worldwide and one of the leading causes of cancer mortality. According to GLOBOCAN, more than 2.3 million new cases of BC are registered annually, accounting for about 24.5% of all malignant neoplasms in women. BC in young women represents a particular clinical problem, accounting for 7–10% of all cases of the disease. It is known that BC in young patients is characterized by a more aggressive course, a high frequency of poorly differentiated tumors, increased proliferative activity, and worse survival rates compared to patients of older age groups.

Neoadjuvant chemotherapy (NACT) is the standard of treatment for locally advanced and biologically aggressive BC, as it allows reduction of tumor size, increases the rate of breast-conserving surgery, and enables assessment of tumor sensitivity to systemic therapy *in vivo*. At the same time, in approximately 30–50% of patients, a complete pathological response is not achieved, which significantly worsens the disease prognosis. The lack of reliable molecular markers capable of predicting tumor sensitivity to NACT necessitates the search for new predictive and prognostic biomarkers, especially for the cohort of young patients.

In recent years, considerable attention has been paid to the role of the tumor microenvironment in shaping therapy sensitivity. Tumor infiltration by immunocompetent cells, particularly B lymphocytes, and the formation of tertiary

lymphoid structures are associated with a better response to systemic treatment and improved survival of BC patients. One of the key chemokines involved in the recruitment of B cells into the tumor microenvironment is CXCL13. Increased CXCL13 expression in tumor tissue has been shown to correlate with intense immune infiltration, higher chemotherapy effectiveness, and a more favorable prognosis of BC. At the same time, the mechanisms regulating CXCL13 expression in tumor tissue remain insufficiently studied.

MicroRNAs are known to play an important role in the post-transcriptional regulation of gene expression — short non-coding RNAs that control the expression of a significant part of the human genome and are involved in the regulation of proliferation, apoptosis, angiogenesis, and antitumor immunity. Dysregulation of microRNA expression is considered one of the key mechanisms of tumor progression and the development of drug resistance. However, the role of microRNAs involved in the regulation of CXCL13 and immune infiltration of BC tumors in young patients has been practically unexplored.

The first stage of the study included a comprehensive analysis of the clinical and morphological characteristics of the tumor process in BC patients of different age groups, as a result of which the presence of significant age-related differences in the course of the disease was demonstrated. The study included 544 BC patients who were treated at the National Cancer Institute in 2021–2024. A comparative analysis of the disease course in young patients and patients of the older age group, depending on the molecular subtype of the tumor, was performed. In particular, the data of 76 women under 40 years of age and 97 patients older than 55 years with the luminal A subtype, 108 and 101, respectively, with the luminal B subtype, 33 and 56 with the HER2/neu-positive subtype, as well as 27 and 56 patients of the respective age groups with triple-negative BC were analyzed. All patients received standardized neoadjuvant polychemotherapy according to the AC regimen (doxorubicin 60 mg/m<sup>2</sup> and cyclophosphamide 600 mg/m<sup>2</sup> every 14 days) followed by weekly administration of paclitaxel 80 mg/m<sup>2</sup>. Treatment effectiveness was assessed according to computed tomography data in accordance with RECIST 1.1 criteria before the start and after

completion of preoperative treatment, and the degree of therapeutic tumor pathomorphosis was determined using the Miller–Payne scale.

It was shown that tumors of the luminal B molecular subtype in young patients are characterized by more aggressive clinical features, differences in proliferative activity, the frequency of metastatic involvement of regional lymph nodes, and peculiarities of the response to neoadjuvant polychemotherapy. The obtained results proved the feasibility of searching for molecular markers capable of reflecting the biological features of neoplasms in this category of patients and increasing the accuracy of predicting treatment effectiveness.

Subsequently, *CXCL13* expression in BC tumor tissue at the mRNA level was studied *in silico*. As a result of the performed bioinformatic analysis, it was shown that *CXCL13* expression is associated with such clinicopathological characteristics of the tumor process as molecular subtypes of BC and patient survival indicators. A relationship between *CXCL13* expression levels and the effectiveness of anthracycline-containing NACT was demonstrated, which confirmed the promise of this chemokine as a component of molecular stratification of patients.

The next stage included an immunohistochemical study of *CXCL13* expression in tumor tissue *ex vivo*. The prospective part of the study included 120 women with stage II–III BC who were treated at the National Cancer Institute of the Ministry of Health of Ukraine. All patients provided informed consent to participate in the study and to use clinical data for scientific purposes. Within the framework of standard clinical examination performed in accordance with the current orders of the Ministry of Health of Ukraine and international diagnostic guidelines, all patients underwent a comprehensive assessment of general clinical and biochemical status, instrumental imaging methods (abdominal ultrasound, mammography, chest radiography), as well as morphological verification of the tumor by core biopsy. Tumor staging was performed according to the TNM classification (8th edition). Biopsy samples of tumor tissue as well as blood samples were obtained before the start of neoadjuvant polychemotherapy. All patients received standardized treatment according to the AC regimen (doxorubicin 60 mg/m<sup>2</sup> and cyclophosphamide 600 mg/m<sup>2</sup> every 21 days, 4

cycles) followed by surgical treatment in the form of breast-conserving surgery or Madden radical mastectomy according to clinical indications. The effectiveness of NACT was assessed dynamically every 2 cycles according to mammography data in accordance with RECIST 1.1 criteria, and the degree of therapeutic tumor pathomorphosis was determined using the Miller–Payne scale.

As a result of the performed analysis, the presence of CXCL13-positive cells in the tumor microenvironment was demonstrated and their association with clinicopathological characteristics of neoplasms was shown. It was proven that the number of CXCL13-positive cells differs depending on patient age, tumor molecular subtype, and the effectiveness of neoadjuvant polychemotherapy. The obtained results confirmed the clinical significance of CXCL13 as a marker reflecting the biological features of the tumor microenvironment.

Using bioinformatic approaches, microRNAs potentially involved in the regulation of CXCL13 gene expression were identified. As a result of the *in silico* analysis, microRNA-26b-5p and microRNA-186-5p were shown to be promising candidates for the role of CXCL13 regulators and may have clinical significance in BC. *In silico*, an association of the expression levels of these microRNAs with clinical characteristics of the disease and patient survival indicators was demonstrated, which substantiates the feasibility of their further experimental study.

Further research was performed on clinical material in the *ex vivo* system. As a result of the analysis of microRNA-26b-5p and microRNA-186-5p expression in tumor tissue, age-related features of their regulation were demonstrated. It was shown that tumors of young patients are characterized by a specific expression profile of the studied microRNAs. An association of the expression levels of microRNA-26b-5p and microRNA-186-5p with clinicopathological characteristics of the tumor process, disease stage, status of regional lymph node involvement, and molecular subtypes of BC was proven.

Special attention was paid to the assessment of the predictive significance of the studied microRNAs. The analysis demonstrated an association between microRNA-186-5p expression levels and tumor sensitivity to NACT. It was shown that

changes in the expression of the studied microRNAs may reflect the development of tumor resistance to anthracycline-containing treatment regimens.

Thus, the conducted study made it possible to comprehensively characterize the role of CXCL13 and related microRNAs in the biology of BC in young patients. Generalization of the obtained results indicates that the combined use of CXCL13 expression indicators and regulatory microRNAs creates a basis for the development of new approaches to predicting the disease course and personalizing the treatment of BC patients.

**Keywords:** breast cancer, adenocarcinoma, young patients, tumor, molecular subtype, CXCL13, microRNA-26b-5p, microRNA-181-5p, therapy personalization, disease course, prognosis, survival, neoadjuvant polychemotherapy, irradiation, doxorubicin, resistance, metastases.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Martyniuk O., Mushii , A. Pavlova. Integrated Serum and Tumor Analysis of hsa-miR-26b-5p and hsa-miR- 186-5p Reveals Their Prognostic and Predictive Significance in Breast Cancer. *Exp Oncol.* 2026;48(1):31-39. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2026.01.031> (Особистий внесок здобувача: отримання біологічного матеріалу для дослідження, обробка отриманих результатів).
2. Martyniuk O, Mushii O, Chekhun V. Role of miR-26b-5p and miR-186-5p in breast cancer patients of young age: clinical associations and relation to anthracycline response. *Exp Oncol.* 2025;47(4):459-466. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.04.459> (Особистий внесок здобувача: отримання біологічного матеріалу для дослідження, обробка отриманих результатів, оформлення та написання статті).
3. Martyniuk O, Smolanka I, Smolanka I, Med V, Tarasenko T, Chekhun V. Clinico-morphological features of the luminal b subtype of breast cancer in young women. *Exp Oncol.* 2025; 47(2):245-250. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.02.245> (Особистий внесок здобувача: отримання клінічних даних для проведення дослідження, обробка отриманих результатів, оформлення та написання статті).
4. О.М. Мартинюк, В.Ф. Чехун. Вікові особливості експресії CXCL13 у тканині раку молочної залози та їх прогностичне і предиктивне значення. *Онкологія*, – 2025, 24(4): 232-239. <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.04.232> (Особистий внесок здобувача: отримання клініко-морфологічного матеріалу для дослідження, обробка отриманих результатів, оформлення та написання статті).
5. Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна, С.А. Лялькин, Т.Є. Тарасенко, О.М. Мартинюк. Вплив поліморфізмів хемокінів на ефективність хіміотерапії у хворих на Her2/неу-негативний рак грудної залози // *Клінічна онкологія*, – 2023, 11(43-

44):1-3. <https://doi.org/10.32471/clinicaloncology.2663-466X.43-3.28300>  
(Особистий внесок здобувача: отримання клінічних даних для проведення дослідження, обробка отриманих результатів, оформлення та написання статті).

6. Бондар М.В., Сивак Л.А., Тарасенко Т.Є., Мартинюк О.М., Лялькін С.А., Шудрак П.А. Особливості перебігу раку грудної залози з низьким рівнем експресії HER2/neu. Клінічна онкологія, – 2023, 13(50):1-3. <https://doi.org/10.32471/clinicaloncology.2663-466X.50-2.30634> (Особистий внесок здобувача: отримання клінічних даних для проведення дослідження, обробка отриманих результатів, оформлення та написання статті).

7. O. Martyniuk, I. Smolanka (prof), I. Smolanka (junior), V. Chekhun (prof.), A. Lyashenko, T. Tarasenko, O. Lygyrda, P Shudrak, P156: The relevance of rising breast cancer incidence among young women under 45 in Ukraine: challenges in oncofertility. The Breast.2025. Volume 80, Supplement of 19th St. Gallen International Breast Cancer Conference, 12th - 15<sup>th</sup> March, Vienna, 2025.

8. O. Martyniuk, T. Tarasenko, L. Syvak, S. Lyalkin, M. Bondar. The impact of extraordinary situations such as war on tumor characteristics and time before the start of treatment in patients with non-metastatic breast cancer (BC), The Breast, Volume 68, Supplement, 2023, Page S124, ISSN 0960-9776, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00389-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00389-2).

9. Tetiana Tarasenko, Liubov Syvak, Olena Martyniuk, Maryna Bondar. Assessment of early progression risk for patient with ESR1 mutations and hormone receptor positive (HR+)/HER2-negative metastatic breast cancer (MBC), The Breast, Volume 71, Supplement 1, 2023, Pages S52-S53, ISSN 0960-9776, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00674-4).

10. Tarasenko T, Syvak L, Martyniuk O, Lyalkin S, Verovkina N, Kovalenko A. Characteristics of patients with metastatic luminal breast cancer (MLBC) and ESR1 polymorphism, European Journal of Cancer, 175S71, [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(22\)01539-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(22)01539-8)

11. Bondar M, Tarasenko T, Martyniuk O, Syvak L. Prevalence and clinical features of HER2-low breast cancer among Ukrainian population. *The Breast*, 71S54, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00678-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00678-1)

12. Martyniuk O, Tarasenko T, Chekhun V, Smolanka I, Bondar M., Shudrak P. This study evaluates the impact of metabolic syndrome on pathological response in young patients ( $\leq 45$  years) with HER2-neu negative breast cancer after preoperative chemotherapy. The study includes the analysis of pathologic data to determine the relationship between metabolic status and treatment efficacy. *European Journal of Cancer*, 200. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2024.113701>

13. Методичні рекомендації «МікроРНК як прогностичні маркери раку молочної залози у хворих молодого віку» (В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, О.В. Кашуба, Т.В. Борікун, Т.В. Задворний, В.М. Базась, І.В. Шепеленко, О.М. Мартинюк, О.М. Мушій, А.О. Павлова, С.А. Лялькін, М.С. Кротевич – К., 2023. – 22 с.). [https://www.iepor.site/?page\\_id=250](https://www.iepor.site/?page_id=250)

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ .....	18
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	27
1.1. Етіологія, епідеміологія та вікові особливості раку грудної залози.....	27
1.2. Молекулярно-біологічні особливості раку грудної залози у хворих молодого віку.....	30
1.3. Роль CXCL13 при розвитку та прогресуванні РГЗ .....	40
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	45
2.1. Клінічна характеристика хворих на РГЗ різних вікових груп .....	45
2.2. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі .....	49
2.3. Імуногістохімічний аналіз експресії CXCL13 .....	52
2.4. Біоінформатичний аналіз.....	52
2.5. Статистичний аналіз .....	53
РОЗДІЛ 3. РЕТРОСПЕКТИВНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ У ХВОРИХ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗАЛЕЖНО ВІД МОЛЕКУЛЯРНОГО ПІДТИПУ НОВОУТВОРЕНЬ .....	54
РОЗДІЛ 4. ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ CXCL13 У ТКАНИНІ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ ПРОГНОСТИЧНЕ І ПРЕДИКТИВНЕ ЗНАЧЕННЯ.	63
4.1. Дослідження особливостей експресії CXCL13 у тканині РГЗ в системі <i>in silico</i> .....	63
4.1.1. Аналіз показників експресії CXCL13 на рівні мРНК та білка у тканині РГЗ із використанням бази даних UALCAN .....	63

4.1.2. Аналіз показників безрецидивної та загальної виживаності хворих на РГЗ залежно від експресії <i>CXCL13</i> на рівні мРНК та білка із використанням бази даних Kaplan-Meier Plotter .....	68
4.1.3. Аналіз показників експресії <i>CXCL13</i> для прогнозування ефективності антрацилін-вмісної неoad'ювантної поліхіміотерапії у хворих на РГЗ із використанням бази даних ROC-Plotter. ....	71
4.2. Зв'язок показників експресії <i>CXCL13</i> на рівні білка у пухлинній тканині із клінічним статусом хворих на РГЗ із врахуванням вікових особливостей пацієнток .....	74
<b>РОЗДІЛ 5. ПРОГНОСТИЧНЕ ТА ПРЕДИКТИВНЕ ЗНАЧЕННЯ ПУХЛИНО-АСОЦІЙОВАНИХ мікроРНК-26b-5p ТА мікроРНК-186-5p У ТКАНИНІ РГЗ ХВОРИХ МОЛОДОГО ВІКУ .....</b>	<b>82</b>
5.1. Біоінформатичний аналіз зв'язку показників експресії пухлинно-асоційованих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p з клініко-патологічними характеристиками РГЗ із використанням бази даних UALCAN. ....	82
5.2. Дослідження зв'язку показників пухлино-асоційованих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у тканині РГЗ хворих із різним клінічним статусом з урахуванням віку .....	98
5.3. Значення пухлинно-асоційованих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p для прогнозування ефективності лікування хворих на РГЗ за схемою 4АС у неoad'ювантному режимі. ....	103
5.4. Дослідження зв'язку показників циркулюючих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p із клінічним статусом хворих на РГЗ з урахуванням віку....	105
5.5. Предиктивне значення циркулюючих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у хворих на РГЗ , що проходили лікування за схемою 4АС у неoad'ювантному режимі. ....	110
<b>РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ .....</b>	<b>113</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>120</b>

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	122
ДОДАТОК А.....	138
ДОДАТОК Б.....	141

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ**

PG3	-	рак грудної залози
PR	-	рецептор прогестерону
ER	-	Рецептор естрогену
Her2/neu	-	рецептор людського епідермального фактора росту 2 типу
GATA3	-	GATA зв'язуючий протеїн 3
MMP	-	матриксні металопротеїнази
SASP	-	сенесцент асоційований секреторний фенотип
IFN $\gamma$	-	інтерферон гамма
PD-L1	-	ліганд програмованої смерті 1
PD1	-	рецептор програмованої смерті 1
PIV	-	панімурний показник запалення
CXCL13	-	C-X-C мотив хемокіновий ліганд 13
CXCR5	-	C-X-C мотив хемокіновий рецептор 5
pCR	-	повна патологічна відповідь
НПХТ	-	неoad'ювантна поліхіміотерапія
УЗД	-	ультразвукове дослідження
IDC	-	інвазивна протокова аденокарцинома
ILC	-	інвазивна долькова аденокарцинома

## ВСТУП

### **Актуальність теми.**

Статистичні дані останніх десятирічч свідчать про неухильне зростання показників захворюваності на рак грудної залози (РГЗ) серед жінок молодого віку, який посідає перше місце у структурі захворюваності пацієнток віком 18-29 років та є однією із провідних причин смертності у віковому діапазоні 15-39 років [1]. Відомо, що рак у пацієнток молодого віку відрізняється від такого в осіб літнього віку за агресивністю клінічного перебігу, гістологічною будовою та молекулярним профілем. У віковій групі 18–24 років РГЗ займає третє місце у структурі захворюваності українок (10,8%), а з 30 до 74 років – перше (17,6–20,6%) [2]. У структурі смертності жіночого населення від раку РГЗ переважає у вікових групах 30–54, 55–74 та 75+ років і складає 24,5%, 20,6% та 18,5%, відповідно [3]. Враховуючи зазначене, пошук факторів, які б дозволили спрогнозувати агресивний потенціал та здійснити оцінку ефективності медикаментозного лікування з урахуванням біологічних особливостей пухлинних клітин, є пріоритетним напрямком досліджень.

Останніми роками активно здійснюється пошук універсального підходу та створення віртуальних модельних систем, здатних систематизувати, інтегрувати й узгоджувати результати численних досліджень, присвячених ідентифікації молекулярно-генетичних, клініко-патологічних та епігенетичних порушень при розвитку і прогресії РГЗ. Важливою складовою такого підходу є вивчення пухлинного мікрооточення, яке розглядається як динамічна та багатокомпонентна система взаємодії пухлинних клітин із клітинами імунної системи, фібробластами, ендотеліальними клітинами, позаклітинним матриксом та розчинними сигнальними молекулами [4]. Саме в межах пухлинного мікрооточення формується широкий спектр потенційних біомаркерів, що відображають проліферативну активність пухлини, її інвазивність, здатність до метастазування та формування фенотипу медикаментозної резистентності. Особливу увагу приділяють хемокінам, які виступають центральними регуляторами міграції імунних клітин, ангиогенезу та міжклітинної взаємодії в

межах пухлинного мікрооточення. Вони забезпечують рекрутинг імунних клітин до пухлини, беруть участь у формуванні імуносупресивних ніш і водночас можуть як посилювати протипухлинний імунітет, так і сприяти інвазії та метастазуванню. Серед таких сигнальних систем важливе місце займає вісь CXCL13–CXCR5, що бере участь у регуляції гуморальної імунної відповіді та формуванні вторинних і третинних лімфоїдних структур [5].

CXCL13 забезпечує спрямовану міграцію CXCR5-позитивних клітин, зокрема В-лімфоцитів і Tfh-клітин, відіграючи ключову роль в організації локальної імунної відповіді та підтримці функціональної архітекtonіки гермінативних центрів [6]. Порушення регуляції цієї осі пов'язують із хронічним запаленням, імунною дисфункцією та прогресією пухлинного процесу. У випадку РГЗ експресія CXCL13 розглядається як показник активації пухлинного мікрооточення та рівня організації локальної адаптивної імунної відповіді, оскільки вона асоціюється з інфільтрацією пухлини лімфоцитами, наявністю В-клітин і формуванням третинних лімфоїдних структур [7].

Одним із актуальних напрямів фундаментальної онкології останніх років є вивчення епігенетичних порушень експресії генів пухлинного мікрооточення при розвитку та прогресії РГЗ. Серед великої кількості досліджуваних мікроРНК особливу увагу привертають мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p, які беруть участь у регуляції ключових онкогенних та супресорних шляхів при РГЗ, включаючи контроль клітинного циклу, апоптозу, інвазії та ремоделювання позаклітинного матриксу. Зокрема, мікроРНК-26b-5p здатна пригнічувати експресію генів, що сприяють проліферації та метастазуванню при новоутвореннях деяких локалізацій [8], тоді як дизрегуляція рівня експресії мікроРНК-186-5p асоціюється з відсутністю чутливості до медикаментозних препаратів [9, 10]. Ці властивості роблять їх потенційними маркерами для прогнозування перебігу захворювання та оцінки відповіді на терапію, включаючи стандартні режимні схеми, зокрема 4АС (доксорубіцин + циклофосфамід), які широко застосовуються у неoad'ювантному та ад'ювантному режимах при лікуванні РГЗ. З огляду на біологічну роль цих

мікроРНК та їхню стабільність у циркулюючих біологічних рідинах, інтеграція їх аналізу у клінічні алгоритми може значно покращити точність прогнозування перебігу захворювання, дозволити диференційовано підходити до вибору терапевтичної стратегії та своєчасно коригувати тактику лікування в кожному конкретному випадку. Водночас наявність розбіжностей результатів у попередніх дослідженнях підкреслює необхідність комплексного аналізу, що включає оцінку рівня цих мікроРНК в пухлинній тканині, з урахуванням клінічних характеристик пацієток та специфіки проведеної терапії.

**Мета дослідження:** обґрунтувати доцільність використання показників експресії *CXCL13* для оцінки агресивності перебігу та прогнозування ефективності неoad'ювантної поліхіміотерапії у хворих на рак грудної залози молодого віку.

**Завдання дослідження:**

1. Провести аналіз віддалених результатів лікування хворих на РГЗ молодого віку з урахуванням клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу.
2. Дослідити топологію та кількісні показники експресії *CXCL13* у тканині РГЗ хворих молодого віку.
3. Проаналізувати зв'язок показників експресії *CXCL13* зі ступенем розповсюдженості РГЗ та клінічною ефективністю неoad'ювантної поліхіміотерапії в режимі 4АС у хворих молодого віку.
4. Вивчити особливості експресії пухлинно-асоційованих і циркулюючих мікроРНК, задіяних у регуляції експресії гена *CXCL13*, та оцінити їх клінічне значення у хворих на РГЗ молодого віку.
5. З'ясувати можливість використання *CXCL13* та мікроРНК, задіяних у регуляції його експресії, як прогностичних та предиктивних маркерів РГЗ у пацієток молодого віку та розробити алгоритм стратифікації ризику прогресії пухлинного процесу.

*Об'єкт дослідження:* РГЗ.

*Предмет дослідження:* CXCL13 та регуляторні мікроРНК, як маркери прогнозування перебігу та оцінки ефективності неoad'ювантної поліхіміотерапії в режимі 4АС у хворих на РГЗ молодого віку.

#### **Методи дослідження.**

Біоінформатичний аналіз зв'язку експресії CXCL13 на рівні мРНК та білка, а також регуляторних пухлинно-асоційованих мікроРНК із клініко-патологічними характеристиками та показниками загальної і безрецидивної виживаності хворих на РГЗ із використанням бази даних UALCAN. *in silico* оцінка перспективи використання показників експресії CXCL13 для прогнозування ефективності антрацилін-вмісної неoad'ювантної поліхіміотерапії у хворих на РГЗ із використанням бази даних ROC-Plotter. Експресію CXCL13 на рівні білка оцінювали методом імуногістохімії. Рівні експресії пухлиноасоційованих та циркулюючих мікроРНК визначали методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Достовірність відмінностей між показниками двох незалежних груп за кількісною ознакою оцінювали за допомогою t-критерію Стюдента або U-критерію Манна-Уїтні відповідно до характеру розподілу даних вибірки. Достовірними вважали розбіжності при  $p < 0,05$ .

#### **Наукова новизна отриманих результатів.**

Вперше на підставі комплексного клінічного та молекулярно-біологічного дослідження РГЗ з'ясовано прогностичне та предиктивне значення CXCL13 у хворих молодого віку.

Доповнено дані щодо гетерогенності клініко-патологічних ознак та особливостей пухлинного мікрооточення РГЗ у хворих молодого віку. Доведено, що агресивність перебігу люмінального Б підтипу РГЗ має чітку вікову залежність і характеризується високим ступенем злоякісності у хворих молодше 45 років за рахунок підвищення проліферативного індексу Ki-67 та потенцій до лімфогенного метастазування, що асоціюється із порушенням експресії CXCL13.

Вперше встановлено асоціацію показників експресії CXCL13 у пухлинній

тканині хворих молодого віку з такими показниками злоякісності РГЗ, як стадія пухлинного процесу та молекулярний підтип новоутворень. Доведено, що високий ступінь злоякісності РГЗ пов'язаний зі збільшенням рівня експресії циркулюючої та пухлинно-асоційованої мікроРНК-26b-5p, а також зі зниженням рівня експресії мікроРНК-186-5p у сироватці крові хворих молодого віку. Про це свідчить достовірний прямий кореляційний зв'язок між рівнем експресії мікроРНК-26b-5p та обернений кореляційний зв'язок мікроРНК-186-5p зі стадією РГЗ, категоріями T і N, ступенем диференціювання та молекулярним підтипом новоутворень.

Вперше визначено зв'язок експресії CXCL13 із чутливістю РГЗ хворих молодого віку до неoad'ювантної поліхіміотерапії за схемою 4АС. Найвищі показники експресії CXCL13 на тлі зниження рівня експресії мікроРНК-186-5p у пухлинній тканині та сироватці крові хворих зареєстровано за наявності високого ступеня лікувального патоморфозу за Miller-Payne.

#### **Практичне значення отриманих результатів.**

На основі проведених досліджень ідентифіковано клініко-патологічні та молекулярно-біологічні ознаки РГЗ у хворих молодого віку та розроблено алгоритм формування груп високого ризику прогресії РГЗ люмінального В молекулярного підтипу, що може бути використаний для індивідуалізації лікування та моніторингу перебігу захворювання у пацієнток молодого віку.

Отримані результати розширюють можливості персоніфікації лікування хворих молодого віку на РГЗ та можуть бути використані у клінічній онкологічній практиці для оптимізації підходів до терапії. Ідентифіковані клініко-патологічні та молекулярно-біологічні показники можуть застосовуватися як додаткові критерії стратифікації пацієнток з РГЗ молодого віку за ступенем чутливості до неoad'ювантного лікування.

Запропоноване використання рівня експресії CXCL13 у тканині РГЗ як прогностичного та предиктивного маркера може бути впроваджене для раннього прогнозування ефективності неoad'ювантної поліхіміотерапії за схемою 4АС та оптимізації вибору лікувальної тактики у хворих молодого віку. Визначення

експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p може бути використане як додатковий інструмент оцінки агресивності перебігу пухлинного процесу, ризику метастазування та ймовірності формування медикаментозної резистентності до антрациклін-вмісної терапії.

Розроблений алгоритм дозволяє з високою точністю здійснювати формування груп високого ризику прогресії пухлинного процесу та проводити персоналізовану корекцію схем терапії з урахуванням молекулярного підтипу РГЗ, вікових особливостей та репродуктивного статусу пацієток, що забезпечить зниження частоти ускладнень та сприятиме покращенню якості лікування.

Теоретично-експериментальні результати дисертаційної роботи впроваджені в клінічну практику КНП київської обласної ради «Київський обласний онкологічний диспансер», Київському міському клінічному онкологічному центрі, КНП «Прикарпатський клінічний онкологічний центр» ІФ ОР та ДНП «Національному інституті раку» відповідно до актів впровадження та методичних рекомендацій щодо реалізації способів їх імплементації.

Результати дослідження можуть бути використані в навчальному процесі закладів вищої медичної освіти та у подальших наукових дослідженнях, спрямованих на розробку інноваційних панелей біомаркерів для прогнозування перебігу захворювання та ефективності медикаментозного лікування хворих на РГЗ.

**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 за темами: «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» (2022-2023, номер держреєстрації 0122U201203), та «Стрес-індуковані фактори пухлинного мікрооточення як драйвери ризику прогресії раку молочної залози» (2024-2028, номер держреєстрації 0124U000078).

### **Особистий внесок здобувача.**

Авторкою самостійно здійснено аналіз сучасних літературних джерел і проведено оцінку клініко-патологічних характеристик РГЗ у пацієнток різних вікових груп, сформовано дослідну вибірку та підібрано колекцію зразків пухлинної тканини і сироватки крові хворих на РГЗ, виконано клінічний огляд та обстеження пацієнток. У співпраці з науковим керівником визначено основні напрями, завдання дослідження та здійснено інтерпретацію отриманих результатів. , що забезпечило отримання нових науково обґрунтованих теоретичних і практичних результатів та вирішення конкретного наукового завдання — розроблення алгоритму оцінки ефективності поліхіміотерапії у неoad'ювантному режимі за схемою 4АС у пацієнток із РГЗ молодого віку. Авторка особисто провела статистичну обробку даних.

### **Апробація результатів дисертації.**

Результати власних досліджень О.М. Мартинюк були представлені у формі усних доповідей на ряді міжнародних та вітчизняних конференцій: European Breast Cancer Conference EBCC-13, 16-18 November, Barselona, 2022), 18th St. Gallen International Breast Cancer Conference (15th - 18th March, Vienna, 2023), «UPTODATE 4.0 +МОЛЕКУЛЯРНІ ЗУСТРІЧІ» (23-24 листопада, Київ, 2023), Masterclass in Clinical Oncology - Summer edition Varese (, 23-27, June 2023, Italy), 14th European Breast Cancer Conference (EBCC-14) (20-22 March, Milan, 2024), 19th St. Gallen International Breast Cancer Conference (12th - 15th March, Vienna, 2025).

### **Публікації.**

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, зокрема: 6 статей, серед яких 3 публікації у виданні, що індексується наукометричною базою Scopus та Web of Science, 6 тез у матеріалах конференцій, конгресів, з'їздів, в тому числі міжнародних, одні методичні рекомендації.

### **Обсяг та структура дисертації.**

Дисертацію викладено на 143 сторінках, складається з анотації, списку робіт здобувача за темою, вступу, 6 розділів (зокрема огляду літератури,

матеріалів і методів, 4 розділів власних досліджень), узагальнення і аналізу отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел літератури, що містить 137 найменувань, а також 2 додатків. Робота ілюстрована 8 таблицями та 53 рисунками.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

### 1.1. Етіологія, епідеміологія та вікові особливості раку грудної залози

Аналіз світових та вітчизняних статистичних показників щодо стану та розвитку онкопатології, на межі тисячоліть, свідчить про стрімке зростання злякисних новоутворень грудної залози [1-3, 11, 12].

Згідно з експертними даними, нинішній етап протипухлинної боротьби характеризується, з одного боку, значним прогресом в оптимізації діагностики і підвищенні ефективності терапії такої категорії хворих, з іншого – неухильним ростом захворюваності і появою все більш агресивних форм раку. За оцінкою Cancer Statistics, у 2020 році, на тлі всіх нозологічних форм злякисних новоутворень, рак грудної залози (РГЗ) випередив навіть захворюваність на рак легень, та впевнено лідирує у рейтингу провідних причин смерті від раку [1].

РГЗ, як найбільш розповсюджена форма онкопатології, привертає до себе увагу стрімким зростанням обсягу інформації, щодо етіологічних факторів, молекулярно-генетичних ланок патогенезу та особливостей біології пухлинної клітини. Домінантною в дослідженнях РГЗ виявилися вікові показники, з тенденцією до приросту захворюваності у жінок молодого і дуже молодого віку та з одночасним зростанням у цієї категорії пацієнтів більш агресивних форм його фенотипу та менш сприятливим прогнозом перебігу [1, 13].

За останні 30 років, згідно з даними GLOBALCAN, відсоток виявлення вперше діагностованого РГЗ серед дуже молодих пацієнтів (до 34 років) достовірно зростає [14-17]. Як наслідок, у структурі захворюваності жінок у віковій групі 18–29 років РГЗ посідає перше місце та є однією із провідних причин смертності у віковому діапазоні 15–39 років [2, 18]. Аналіз даних ретроспективного епідеміологічного дослідження в семи європейських країнах виявив, що середній показник захворюваності на РГЗ у молодих жінок збільшується на 1,2% щорічно. У віковій групі пацієток від 15 до 34 років, порівняно з жінками старшого віку (35–39 років), визначено найбільше зростання у всіх країнах світу, включно із країнами із високим рівнем соціально-економічного достатку [3, 19-21].

Вважається, що молодий вік є незалежним несприятливим прогностичним фактором РГЗ. Провідні онкологи світу виділяють РГЗ у молодих, як окремий напрямок молекулярно-біологічних та клінічних досліджень, що дозволить більш глибоко зрозуміти причини його агресивності та визначити шляхи спеціального лікування. Згідно з даними ВООЗ 2017 р., молодим вважається вік від 25 до 44 років [22, 23]. В той час як за даними наукової літератури визначення «молоді або дуже молоді жінки» варіює від 35 до 40 років [24,25].

Основними передумовами до більш глибокого вивчення проблеми РГЗ у молодих пацієнок є виявлення агресивності його перебігу в різних варіантах молекулярно-біологічних підтипів новоутворень. Молодий вік хворих на РГЗ асоціюється з несприятливим прогнозом та низькими показниками їх виживаності. На сьогодні все частіше онкологи визначають клінічний фактор як важливий предиктор агресивності РГЗ, порівняно з жінками старшого віку. Проведення нових молекулярно-біологічних досліджень, спеціально у молодших пацієнок, продиктовано необхідністю покращення результатів скринінгу, профілактики, лікування та діагностики раку [26].

Одним із перших підтверджуючих даних про важливість дослідження РГЗ у молодих осіб став ретроспективний аналіз епідіміології РГЗ у осіб молодого віку за 25 років, проведений Національним інститутом раку США, згідно даних якого показники виживаності були меншими у пацієнок до 40 років, порівняно з жінками старшого віку [27]. Найнижчу загальну 5-річну виживаність встановлено у жінок віком 25–29 років (72%), у той час як аналогічні показники виживаності хворих на РГЗ у вікових категоріях 30–34 років та 35–39 років становили 76% та 80% відповідно. На противагу цьому, середні показники загальної 5-річної виживаності жінок з діагностованим РГЗ віком від 45 до 80 років були більшими і складали 84-86% [26, 27].

В ході ретроспективного дослідження відкритого ресурсу Registro de Cáncer de Mama Аргентинського товариства мамологів, яке проводилося з січня 2000 року по січень 2017 року, виявлено значні клініко-патологічні відмінності між молодими ( $\leq 40$  років) і дуже молодими ( $\leq 35$  років) пацієнтками, які дозволяють

у групі молодших пацієнок ідентифікувати більш агресивний фенотип. Багатофакторний аналіз показав, що Her2/neu-позитивний фенотип пухлини, гістологічний ступінь і розмір пухлини були незалежно пов'язані з молодшим віком ( $n = 286$ ). Хворі до 35 років, порівняно з пацієнтами віком від 36 до 40 років, мали більший відсоток HER2/neu-позитивних пухлин та новоутворень з негативною експресією рецепторів прогестерону (PR). Аналогічні дані щодо більш агресивного перебігу РГЗ за надмірної експресії Her2/neu, пов'язані з молодим віком  $\leq 35$ , підтверджуються й іншими клінічними дослідженнями [20, 28].

Доведено, що РГЗ у пацієнок молодого віку характеризується високою агресивністю перебігу злякисного процесу, високим ризиком виникнення метастатичних уражень, низьким рівнем чутливості до медикаментозної терапії, швидким розвитком місцевих рецидивів, що є основною причиною високої смертності жінок у цій віковій групі. При порівняльному дослідженні клініко-патологічних та молекулярно-біологічних ознак новоутворень грудної залози у пацієнок різних вікових категорій було з'ясовано, що у групі хворих молодого віку визначалась найбільша частота розповсюдженого РГЗ з наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів та віддалених органів порівняно з хворими після 45 років [29].

Зазначені клінічно-морфологічні особливості перебігу хвороби, підвищений ризик прогресування та ініціації РГЗ у жінок молодого і дуже молодого віку, все частіше розглядаються як окремий напрямок у вивченні та дослідженні шляхів спеціального лікування. Підвищена обізнаність щодо здоров'я, ефективні стратегії профілактики, діагностики, покращений доступ до медичного лікування — надзвичайно важливі для стримування стрімкого розвитку РГЗ у дуже молодого населення [15, 25, 30].

## **1.2. Молекулярно-біологічні особливості раку грудної залози у хворих молодого віку.**

Останнім часом проводиться активний пошук умовного знаменника та розробка віртуальних модельних систем, які б дозволили інвентаризувати, інтегрувати та синхронізувати результати численних досліджень щодо виявлених окремих молекулярно-генетичних, клініко-патологічних та епігенетичних порушень у розвитку РГЗ.

В результаті проведеного аналізу даних літератури щодо факторів та механізмів ініціації РГЗ серед пацієнок різних вікових груп виявлені як первинні моно- або полі- молекулярно-генетичні гормональні порушення, так і процеси, які пов'язані із особливостями сучасного соціально-побутового ритму життя та структури харчування. Так, зокрема, згідно з даними, опублікованими на американському ресурсі National Center for Health Statistics Data, зміна харчових вподобань жителів США у період 1889–2009 років тісно пов'язана зі зростанням кількості осіб із надлишковою вагою, ожирінням та екстремальним ожирінням [31]. В дослідженнях Kelly доведено, що кількість людей із надмірною вагою з 1980 до 2008 року майже подвоїлася, а згідно з існуючими прогнозами цей показник до 2030 р. може сягнути 57,8% [32]. В той же час встановлено, що метаболічні порушення, спричинені дисбалансом біохімічних нутрієнтів, впливають як на загальний стан організму, так і на формування агресивного мікрооточення пухлинного вогнища [33].

На сьогодні доведено, що дисбаланс інсуліну виступає тригером метаболічних порушень, які здатні пригнічувати апоптоз та підвищувати проліферацію пухлинних клітин [34, 35]. В процесі проспективного когортного дослідження, опублікованого Goodwin P.J. у 2020 році, встановлено, що високий ступінь агресивності пухлини та ураження пахвових лімфатичних вузлів пов'язані із рівнем інсуліну в плазмі крові. Пацієнти з найвищим показником рівня інсуліну мали підвищений ризик розвитку рецидиву захворювання [36].

Одночасно із наростанням метаболічних порушень спостерігаються зміни в експресії стероїдних гормонів, у тому числі естрогенів як активних промоторів

канцерогенезу. Підвищення рівня естрогену в організмі, спричинене ожирінням, вважається одним із механізмів розвитку РГЗ [37]. Адипоцити посилюють експресію прозапальних факторів, таких як TNF- $\alpha$ , IL-6 та багатьох інших, які через вісь ожиріння-запалення-ароматаза призводять до посилення транспозиції гена *CYP19*, який кодує ароматазу, як ключову ланку синтезу естрогенів. Жирова тканина не тільки зберігає адипоцити, а й є визнаним ендокринним органом, що виробляє біологічно активні молекули, які називаються адипокінами. Адипокіни зв'язуються зі специфічними рецепторами на поверхні клітин-мішеней і впливають на метаболізм тканин і органів. Серед адипокінів лептин підвищує ризик захворювання, тоді як адипонектин може мати захисну дію. Ряд дослідників показав, що низькі рівні адипонектину пов'язані з підвищеним ризиком РГЗ та більш агресивним його фенотипом. Ожиріння сприяє ремоделюванню позаклітинного матриксу грудної залози за рахунок зміни функції адипоцитів, стромальних та ендотеліальних клітин, а також клітин імунної системи. Взаємодія цих клітин моделює секрецію цитокінів, естрогенів та активує ендокринно-ростовий каскад пухлинного мікрооточення, що сприяє агресивності пухлинного процесу та формуванню резистентності до терапії [38].

При поглибленому аналізі молекулярно-біологічних особливостей пухлин в молодій та дуже молодій групі хворих встановлено низку генетичних варіантів із низькою пенетрантністю та рідкісних генетичних мутацій із середньою та високою пенетрантністю, включаючи мутації генів *BRCA1* та *BRCA2* [39-43], які опосередковано беруть участь у розвитку раку грудної залози незалежно від віку. У пухлинах, асоційованих з *BRCA1/2*, часто спостерігається втрата гетерозиготності нормального алеля [44]. Як наслідок – порушення участі в репарації ДНК та втрата регуляції клітинного циклу, що зумовлює накопичення кількості дефектних полемок та збільшує ризик розвитку РГЗ. Інші алелі високої пенетрантності були ідентифіковані як частина успадкованих ракових синдромів. До них належать мутації *TP53* зародкової лінії, виявлені при раковому синдромі Li-Fraumeni [45, 46], мутації зародкової лінії *PTEN* при синдромі Коудена [47] і мутації *STK11/LKB1* у синдромі Пейтца-Єгера [48]. Проте всі відомі генетичні

аберації не дозволяють оцінити причину розвитку РГЗ та не дозволяють в повній мірі пояснити агресивний перебіг захворювання у молодих пацієнтів.

Група вчених, на чолі Natem A. Azim встановила певні відмінності на транскрипторному рівні вибраних генів залежно від віку на момент встановлення діагнозу РГЗ. Також автори вперше визначали відмінності в соматичних мутаціях і варіаціях кількості копій між молодими і літніми пацієнтками з РГЗ та оцінили експресію відповідних геномних сигнатур на рівні мРНК. Було виявлено, що 11 мутацій незалежно пов'язані з віком на момент встановлення діагнозу, серед яких особливо варто відзначити мутацію у гені *GATA3*, яка пов'язана з виникненням РГЗ у молодих жінок (15,2% проти 8,2% проти 9%). Мутація *GATA3* була основною соматичною подією, яка характеризувала пухлину РГЗ, що виникає лише у молодому віці. *GATA3* є важливим компонентом сигналіngu рецептора естрогену (ER) [49]. Доклінічні дані вказують на те, що мутації в *GATA3* також впливають на зв'язування рецептора естрогену з ДНК, модулюють відповідь клітин РГЗ на передачу сигналів естрогену, можуть сприяти росту пухлини і можуть бути пов'язані з ендокринною резистентністю. Це надзвичайно актуально, оскільки несприятливий прогноз, пов'язаний із більш молодим віком на момент встановлення діагнозу, в основному спостерігався у пацієток із РГЗ, позитивними за експресією ER. Має місце припущення, що вища поширеність мутацій *GATA3* у цих пацієнтів може зробити їх більш резистентними до ендокринної терапії.

GATA-зв'язуючий білок 3 (*GATA3*) є членом сімейства з 6 GATA подвійних цинкових пальцевих транскрипційних факторів (*GATA1-6*), які необхідні для розвитку та морфогенезу грудної залози. Фактор транскрипції цинкового пальця *GATA3* вперше був ідентифікований на початку 1990-х років і вважається маркером люмінальних підтипів РГЗ [50].

Встановлено, що *GATA3* необхідний для диференціювання та підтримки епітелію протоків в грудній залозі дорослої людини, а мутації у другому цинковому пальці можуть впливати на зв'язування ДНК, що вказує на його вирішальну роль у розвитку та прогресуванні РГЗ. *GATA3* було ідентифіковано,

як один із найбільш значимих мутованих генів при РГЗ за допомогою повноекзомного секвенування [51].

В подальшому при поглибленому вивченні молекулярно- біологічних властивостей в молодій та дуже молодій групі встановлено, що важливим епігенетичним фактором регуляції експресії *GATA3* виступають мікроРНК, які можуть функціонувати як пухлинні супресори та онкогени [14]. Зокрема, показано, що *GATA3* може пригнічувати метастазування та змінювати мікрооточення пухлини при РГЗ, індукуючи експресію *miR-29b* [15]. Було також продемонстровано, що *miR-30c* регулює транскрипцію *GATA3* в пухлинах грудної залози [41]. Однак роль генетичних варіантів у гені *GATA3* 3'UTR та його посттранскрипційна регуляція не повністю з'ясована. За допомогою біоінформатичного аналізу дослідники показали, що *rs1058240*, розташований у *GATA3* 3'UTR, містить сайти зв'язування із мікроРНК, які можуть бути пов'язані з рівнем експресії мікроРНК, які залучені до посттранскрипційної регуляції *GATA3* [52].

Попередні результати показали життєво важливу роль варіантів *GATA3* в 3'UTR у посттранскрипційній регуляції експресії мРНК. Однак зв'язок регуляції транскрипції *GATA3* з варіаціями 3'UTR вимагає подальшої перевірки, щоб полегшити розробку нових терапевтичних стратегій [15].

Крім того, є попередні дані, що *GATA3* посилює та стабілізує транскрипцію мРНК ER. Навпаки, експресія *GATA3* знижується через індуковану прогестероном активацію PR. Це може пояснити зв'язок наявності мутацій з рецепторним статусом РГЗ [13].

Іншою важливою мутацією при РГЗ у молодих пацієнток виступає *ARID1A*, яка відіграє роль у інгібуванні пухлинного росту та може сприяти ініціації та прогресуванню РГЗ у молодих жінок [53, 54]. Делеція *ARID1A* є незалежним прогностичним фактором інвазивного РГЗ. Низька експресія мРНК *ARID1A* визначається у зразках люмінальних підтипів новоутворень та асоціюється з низькою загальною виживаністю хворих на РГЗ. Крім того, *ARID1A* може мати високу предиктивну цінність при прогнозуванні чутливості до терапії. Мутація

*ARID1A* найчастіше визначається при метастатичному РГЗ, резистентному до фулвестранту. Крім того, порушення регуляції *ARID1A* асоціюється з резистентністю хворих на РГЗ до паклітакселу та до таргетних препаратів [55].

Нещодавні спроби аналізу більш широкого профілю експресії генів пов'язаних із розвитком специфічних біологічних процесів та формування адаптивних функціональних сигнатур дозволили виявити високий рівень експресії компонентів стромального мікрооточення та його асоціацію зі складом імунного інфільтрату, метаболічною активністю та процесами васкуляризації. Пухлинна прогресія провокує підвищення синтезу колагенів з одночасним зростанням мезенхімальних стовбурових клітин з ознаками імуносупресивного фенотипу [56]. На сьогодні встановлено, що характерною ознакою РГЗ хворих молодого віку є низький відсоток строми та високі показники пухлинно-стромального співвідношення, порівняно із жінками старшого віку [57].

Остаточно доведено, що стромальне мікрооточення пухлинного вогнища є складною та динамічною структурою, хімічні та біофізичні властивості якої впливають на клітинну адгезію, проліферацію та міграцію. Основним фібрилярним компонентом строми є колаген, який становить до 30% від загальної маси білка в організмі людини. На сьогодні ідентифіковано 28 різних типів колагенів, що створюють унікальну композицію екстрацелюлярного матриксу у тканинах різного гістогенезу. Встановлено, що експресія та депонування колагену у молочній залозі умовно здорових жінок пременопаузального віку змінюються залежно від стадії менструального циклу. Найбільша кількість волокон колагену у грудній залозі спостерігається після припинення грудного вигодовування. При цьому за своєю топологією такі волокна колагену найбільш схожі на елементи екстрацелюлярного матриксу РГЗ [58].

Відомо, що зміни морфології, репрезентації та організації колагенових волокон при злякисному рості сприяють формуванню унікального мікрооточення, яке стимулює пухлинну прогресію, насамперед через вплив на клітинну міграцію та поляризацію. Крім того, ремоделювання волокон колагену

на премеастатичних ділянках має велике значення для виживання та росту дисемінованих пухлинних клітин. Згідно з даними експериментальних досліджень [59], культивування клітин РГЗ людини у присутності екстрацелюлярного матриксу з використанням 3D-матриці призводило до зростання їх інвазивної активності у випадку нових компонентів ЕЦМ порівняно зі старішими раніше сформованими складовими. Незважаючи на доведену роль стромального мікрооточення у розвитку та прогресуванні РГЗ [60, 61], молекулярно-біологічні параметри дезорганізації та показники експресії колагену, асоційовані з віком хворих, остаточно не з'ясовані та потребують подальших досліджень.

Згідно з даними літератури, функціональний стан колагенового каркасу залежить від активності пухлинно-асоційованих матриксних металопротеаз (ММР). Залежно від функціональної специфічності, усі ММР поділяють на дві групи – колагенази (ММР-2, ММР-9) і желатинази (ММР-1, ММР-8, ММР-13), а також на декілька мінорних груп. Основною функцією ММР є деградація білків і глікопротеїнів екстрацелюлярного матриксу. При злякисному рості ММР здійснюють комунікацію пухлини та стромы, що сприяє інфільтративному росту завдяки активації цитокінів та факторів росту, а також модифікації молекул адгезії. Доведено кореляцію високого рівня експресії ММР-14 у стромальному компоненті пухлинного мікрооточення із віком хворих на РГЗ [62]. Власними дослідженнями підтверджено зв'язок ММР-2, ММР-9 з клініко-патологічними особливостями РГЗ у хворих молодого віку. Встановлено, що характерною ознакою РГЗ хворих молодого віку є низькі показники мРНК ММР-2 на тлі підвищення експресії цієї желатинази на рівні білка, а також зниження експресії ММР9 як на рівні мРНК, так і на рівні білка. Ідентифікований нами зв'язок експресії досліджених желатиназ з такими показниками злякисності РГЗ як стадія, наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів та молекулярний підтип новоутворень у пацієнток молодого віку вказує на перспективність їх використання для прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу у пацієнток молодого віку. [63].

Гетерогенність факторів мікрооточення пухлин пов'язана з експресією окремих асоціацій генів, які забезпечують функціональне формування ландшафту мережі пухлинного мікрооточення, дозволяє розпізнавати що найменше чотири варіанти перебігу агресивності злоякісного процесу лише в рамках тричі негативного молекулярного підтипу РГЗ [64].

На сьогодні відкритим лишається питання щодо прогностичного значення молекулярного підтипу РГЗ у хворих молодого віку. Встановлено, що, виживаність хворих на РГЗ люмінального А та люмінального Б молекулярних підтипів є достовірно меншою у хворих молодого віку у порівнянні з пацієнтками старшого віку, в той час як показники загальної виживаності у різних вікових групах пацієнок з базальним та Her2/neu-позитивним РГЗ практично не відрізнялись [65, 66]. У дослідженнях Liu et al виявлено, що наявність люмінального А молекулярного підтипу РГЗ асоціюється з низькими показниками загальної виживаності та високим ризиком виникнення рецидиву пухлинного процесу у молодих жінок порівняно з пацієнтками старше 40 років [67].

Згідно даних інших клінічних спостережень останніх років [68, 69] найбільш поширеним молекулярним підтипом новоутворень у молодих пацієнок є люмінальний Б РГЗ, який діагностується на 10% частіше, ніж у пацієнок після 45 років, та асоціюється з високим ступенем ураження регіонарних лімфатичних вузлів [70]. При цьому доведено, що проліферативна активність новоутворень є незалежним предиктивним фактором пухлинного перебігу лише у молодих жінок із люмінальним Б молекулярним підтипом РГЗ [71].

Дослідження особливостей транскриптому дозволили ідентифікувати шляхи диференційної експресії генів у різних вікових групах хворих на РГЗ. Було встановлено, що збагачені шляхи і рівні диференційної експресії генів відрізнялися між двома когортними групами за факторами регуляції імунної відповіді та кількома варіантами метаболічних процесів [72].

На сьогодні остаточно доведеним є факт, що старіння є одним із ключових факторів ризику захворюваності на рак, а клітинне старіння (cellular senescence) та зміни мікрооточення є основою підготовки до завершення фізіологічного циклу існування біологічної системи. При пухлинному рості сенесцентні клітини стимулюють продукцію специфічного пулу молекул – senescence-secretory phenotype (SASP) (IL-6, IL-8, MMP-1, IL-1 $\alpha$ , CXCL11 та GM-CSF), які активують проліферацію трансформованих клітин та сприяють прогресії злоякісних новоутворень [73]. Зазначена істина спонукає науковців все більше концентрувати увагу на ролі впливу мікросередовища провідних стромальних компонентів цього процесу на особливості та відмінності, розвитку та перебігу РГЗ у пацієнтів різних вікових груп. Так, зокрема, існуючі експериментальні дані свідчать, що підвищена мамографічна щільність грудної залози є критичним фактором ризику розвитку РГЗ, що створює суттєві перешкоди та обмежує своєчасне рентгенологічне та магнітно-резонансне виявлення новоутворення на ранніх стадіях [27, 28, 74]. Найменша мамографічна щільність та вміст стромального компоненту ідентифікують за наявності гормон-резистентного РГЗ, а високий рівень фіброзу у молочній залозі відзначається у пацієнок молодого віку із наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах [75].

В той же час автори роботи [19] стверджують, що в результаті аналізу існуючих моделей розвитку та прогресування РГЗ зазначені процеси можуть реалізовуватися за рахунок різновекторної підготовки активності інфільтруючих лімфоцитів пухлини та реалізації імунної відповіді організму.

Zirbes et al виявлено, що характерною ознакою РГЗ жінок похилого віку є високий ступінь інфільтрації M2-макрофагів на тлі зниження Т-лімфоцитів, у порівнянні із групою жінок молодого віку [76]. При цьому найбільший ступінь інфільтрації макрофагами визначався у тканині гормон-рефрактерного РГЗ [77].

Ідентифіковані порушення функціональної активності макрофагів та Т-лімфоцитів у тканині РГЗ пацієнтів старшого віку, на думку Erbe et al., обумовлені порушенням сигналіngu інтерферону гама (IFN $\gamma$ ) [78].

В контексті реалізації імунної відповіді у хворих на РГЗ останніми роками досліджується прогностичне значення ліганду 1 програмованої смерті (PD-L1), який експресується на трансформованих клітинах, а його взаємодія із рецептором програмованої смерті 1 (PD1) на поверхні імуніцитів викликає супресію протипухлинного імунітету [79]. Незалежні дослідження Qinet al. а також Muenst et al. встановили, що тканина РГЗ жінок віком до 40 років характеризується достовірно більшими показниками експресії PD-L1, порівняно із тканиною РГЗ пацієнток старшого віку. Виявлено асоціацію рівня PD-L1 у пухлинній тканині хворих молодого віку з такими показниками РГЗ, як стадія пухлинного процесу, наявність ураження регіонарних лімфатичних вузлів, а також ступінь диференціювання новоутворень та їх рецепторний статус [80, 81].

Останнім часом в клінічній практиці для прогнозування агресивності перебігу злоякісних новоутворень, в тому числі РГЗ, активно застосовується показник - Pan-Immune-Inflammation Value (PIV), який відображає співвідношення основних клітинних компонентів периферійної крові (моноцити, тромбоцити, лімфоцити та лейкоцити) і може бути використаний в якості біомаркера, асоційованого з наявністю запального процесу в організмі. З'ясовано, що показники PIV у крові хворих на РГЗ молодого віку були достовірно більшими у порівнянні з жінками старшого віку. Наведені дані вказують на те, що гостре запалення може бути провідним драйвером та фактором ризику розвитку агресивних форм РГЗ у молодих пацієнток [82, 83].

Перевага ознак гострого запалення у молодих проти хронічного запалення у пацієнтів старшого віку потребує детального дослідження й глибокого аналізу на шляху розробки стратегій терапії майбутнього РГЗ у молодих хворих.

Пошук ідеального або оптимального перемикача активності гострого/хронічного запалення — це грань викликів і можливостей. Не варто нехтувати факторами гострого запалення як компонентами нормальної імунної відповіді, спрямованої на знешкодження злоякісних клітин.

Одночасно варто сконцентрувати зусилля на пошуку клітинно-асоційованих компонентів, які виникають та формуються як ознаки хронічного запалення, що

значно переважають у пацієнтів похилого віку та стають “патернами” розвитку й прогресії пухлинної хвороби.

Тому не випадково все більше уваги прикуто до дослідження ролі мікробіоти у розвитку системного та локального запалення, при розвитку і прогресії злоякісних новоутворень [84]. Доведено, що мікроорганізми здатні впливати на ряд фізіологічних та патологічних процесів в організмі людини. Це перш за все здійснюється через впливи на метаболічні шляхи, альтерацію генетичного матеріалу клітин та модуляцію їх сигнальних шляхів. Відомо, що молочна залоза має власну специфічну мікробіоту, яка характеризується гетерогенністю залежно від стадії менструального циклу та є неоднорідною навіть при порівнянні двох залоз в межах одного організму [85]. Доведено, що у тканині грудної залози у мовно здорових донорів переважають бактерії родів *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Corynebacterium* і *Micrococcus*. Натомість у тканині РГЗ визначається підвищення вмісту *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Comamonadaceae* і *Bacteroidetes* [86].

Склад та функціональна активність елементів мікробіоти асоціюється із віком та менструальним статусом хворих на РГЗ, а також корелює із концентрацією естрогену у крові., Доведено, що у жінок із РГЗ у постменопаузі визначаються високі рівні бактерій із груп *Clostridiaceae*, *Faecalibacterium* та *Ruminococcaceae* на тлі низького вмісту представників родин *Dorea* та *Lachnospiraceae* порівняно з хворими молодого віку із збереженою менструальною функцією [87]. Характерною ознакою мікробіоти молодих жінок у пременопаузі з діагностованим РГЗ також є присутність *Bacteroides fragilis* у кишечнику, на відміну від літніх жінок у постменопаузі, які мають більшу кількість кишкової *Klebsiella pneumoniae* [88]. Наведені факти вказують на перспективність подальших досліджень, спрямованих на визначення діагностичного та прогностичного значення складу мікробіоти у хворих на РГЗ молодого віку для розробки індивідуалізованих програм лікування та профілактики.

Розгадка природи формування ландшафту молекулярно-генетичних, цитокіново-ростових та імунних факторів пухлинного мікрооточення новоутворень молодих пацієнток із РГЗ допоможе зрозуміти механізми агресивності перебігу хвороби, що дозволить покращити методики та наблизити застосування методів персоніфікованого лікування хворих на РГЗ як молодого, так і похилого віку.

### **1.3. Роль CXCL13 при розвитку та прогресуванні РГЗ**

РГЗ є гетерогенним захворюванням, що характеризується значною варіабельністю морфологічних, молекулярних та клінічних характеристик. Відповідно до сучасних молекулярних класифікацій, виділяють люмінальний А, люмінальний Б, HER2-позитивний та тричі негативний підтипи, кожен із яких має різний прогноз і чутливість до системної терапії [89, 90]. Враховуючи таку біологічну неоднорідність, у сучасній онкології значна увага приділяється не лише характеристикам пухлинних клітин, але й пухлинному мікрооточенню, яке включає імунні клітини, фібробласти, ендотеліальні клітини, позаклітинний матрикс та широкий спектр сигнальних молекул, зокрема цитокіни і хемокіни. Саме взаємодія між пухлинними клітинами та компонентами мікрооточення визначає ключові процеси пухлинного росту, інвазії, метастазування та відповіді на лікування [91].

У цьому контексті особливу роль відіграють хемокіни як центральні регулятори клітинної міграції та імунної відповіді. Вони забезпечують рекрутинг імунних клітин у пухлину, модулюють ангиогенез, опосередковують взаємодію між пухлинними клітинами та стромальними компонентами, а також беруть участь у формуванні імуносупресивного мікрооточення. Водночас їхня дія є протилежною: поряд з активацією протипухлинного імунітету вони можуть сприяти пухлинній прогресії, інвазії та метастазуванню [5, 92]. Однією з найбільш досліджених сигнальних систем у цьому напрямку є вісь CXCL13–CXCR5, яка відіграє ключову роль у регуляції В-клітинної імунної відповіді та формуванні вторинних і третинних лімфоїдних структур [93].

CXCL13 є хемокіном, який забезпечує міграцію В-лімфоцитів і виступає важливим компонентом організації гуморальної імунної відповіді. Його дія реалізується через рецептор CXCR5, експресований на В-клітинах, T<sub>fh</sub>-клітинах та окремих субпопуляціях Т-лімфоцитів [6]. У фізіологічних умовах CXCL13 продукується фолікулярними дендритними клітинами, стромальними клітинами лімфатичних вузлів та T<sub>fh</sub>-клітинами, формуючи хемотаксичний градієнт, що забезпечує спрямовану міграцію CXCR5-позитивних клітин до гермінативних центрів [94]. Завдяки цьому відбувається просторово-часова організація імунної відповіді, яка включає активацію, проліферацію та диференціацію В-лімфоцитів, афінну селекцію та продукцію антитіл. Таким чином, CXCL13 є необхідним для формування вторинних лімфоїдних органів, підтримки архітектоники гермінативних центрів та забезпечення ефективного гуморального імунітету [95]. Порушення регуляції осі CXCL13–CXCR5 може призводити до дезорганізації імунної відповіді, розвитку хронічного запалення, аутоімунних процесів та пухлинної прогресії [7].

При РГЗ CXCL13 розглядається як один із ключових імунних біомаркерів, що відображає ступінь активації пухлинного мікрооточення та рівень організації локальної протипухлинної відповіді. Підвищена експресія CXCL13 асоціюється з високим рівнем пухлино-інфільтруючих лімфоцитів, наявністю CD20-позитивних В-клітин, активністю T<sub>fh</sub>-клітин та формуванням третинних лімфоїдних структур, які забезпечують локальну презентацію антигену та координацію адаптивної імунної відповіді [96, 97]. Наявність таких структур розглядається як морфологічний та функціональний прояв ефективної протипухлинної імунної реакції.

Клінічні дослідження демонструють, що високий рівень CXCL13 у тканині РГЗ асоціюється зі збільшенням показників безрецидивної та загальної виживаності, а також із більшою ймовірністю досягнення патологічної повної відповіді після неoad'ювантної хіміотерапії. Так, у дослідженні Denkert та співавторів показано, що високий рівень імунної інфільтрації асоціюється зі зростанням частоти повної патологічної відповіді (pCR) до 40–60% у пацієнтів із

тричі негативними та HER2-позитивними підтипами РГЗ [98]. У роботі Song та співавторів встановлено, що експресія CXCL13 прямо корелює з безрецидивною виживаністю хворих та частотою досягнення pCR (HR приблизно 0,5–0,6), що підкреслює його потенційне прогностичне значення [99]. Крім того, наявність CD20-позитивних В-клітин, рекрутинг яких опосередковується CXCL13, асоціюється зі зниженням ризику смерті (HR близько 0,7), що підтверджує значущість гуморального імунітету у контролі пухлинного росту [100].

Найбільш суттєве клінічне значення CXCL13 спостерігається при тричі-негативному та HER2-позитивному підтипах РГЗ, які характеризуються високим рівнем імунної інфільтрації. У цих підтипах CXCL13 може виступати як предиктор відповіді на системну терапію, включно з хіміотерапією, анти-HER2-лікуванням та імунотерапією [101]. Водночас його роль у люмінальних підтипах, зокрема при люмінальному Б РГЗ, залишається недостатньо вивченою, що обумовлює актуальність подальших досліджень у цьому напрямку. Це особливо важливо, враховуючи, що люмінальний Б підтип характеризується більш агресивним перебігом, вищим рівнем проліферації та гіршим прогнозом порівняно з люмінальним А [90].

Окремої уваги заслуговують пацієнтки молодого віку, у яких РГЗ має більш несприятливий клінічний перебіг. За даними літератури, у жінок віком до 45 років частіше виявляються пухлини з високим рівнем Ki-67, більшою частотою ураження лімфатичних вузлів та підвищеним ризиком рецидиву [102]. За результатами дослідження Chen та співавторів, молодий вік асоціюється зі специфічними молекулярними профілями пухлин, у яких CXCL13 входить до імунно-асоційованих генних сигнатур, що відображають особливості пухлинного мікрооточення [103]. Це свідчить про складну біологічну природу пухлин у даній популяції та підкреслює необхідність пошуку додаткових біомаркерів, здатних більш точно відображати перебіг захворювання та прогноз.

У цьому контексті CXCL13 може розглядатися як інтегральний маркер, що поєднує характеристики агресивності пухлини та активності імунного мікрооточення. Його підвищена експресія відображає інтенсивну взаємодію

пухлини з імунною системою та потенційно визначає чутливість до системної терапії. Водночас біологічна роль CXCL13 є неоднозначною. З одного боку, він сприяє формуванню ефективної протипухлинної імунної відповіді через рекрутинг В-клітин та організацію третинних лімфоїдних структур, з іншого — може активувати сигнальні шляхи, пов'язані з пухлинною прогресією. Зокрема, показано, що вісь CXCL13–CXCR5 здатна активувати ERK- та PI3K/АКТ-залежні сигнальні каскади, стимулювати проліферацію пухлинних клітин, їх міграцію, інвазію та епітеліально-мезенхімальний перехід, а також асоціюється з підвищеним ризиком лімфогенного метастазування [104].

Таким чином, CXCL13 при РГЗ слід розглядати як багатофункціональний імунний біомаркер, значення якого визначається балансом між протипухлинною імунною активацією та потенційними механізмами пухлинної прогресії. Його клінічна цінність полягає у можливості використання для прогнозування виживаності, оцінки відповіді на неoad'ювантну терапію та стратифікації ризику. Особливої актуальності набуває вивчення CXCL13 у молодих пацієнток із люмінальним Б підтипом РГЗ, що обумовлює доцільність проведення даного дослідження з метою уточнення його предиктивно-прогностичного значення та потенційного впровадження у клінічну практику.

## РЕЗЮМЕ

РГЗ у жінок молодого віку розглядається як окремий клініко-біологічний підтип захворювання, що характеризується більш агресивним перебігом, високою частотою метастазування, раннім розвитком рецидивів та низькими показниками виживаності порівняно зі старшими пацієнтками. Зростання захворюваності у цій віковій групі визначає необхідність поглибленого вивчення факторів, що впливають на ефективність лікування, зокрема системної протипухлинної терапії. Неоад'ювантна поліхіміотерапія (НПХТ) є одним із ключових етапів лікування локально поширеного РГЗ у молодих пацієнток, однак клінічна відповідь на лікування залишається надзвичайно варіабельною. Значна частина хворих демонструє первинну або набуту резистентність до цитостатиків, що суттєво погіршує прогноз перебігу захворювання. Це обумовлює актуальність пошуку надійних прогностичних і предиктивних маркерів, здатних оцінювати ефективність хіміотерапії ще до початку лікування та оптимізувати персоналізований підхід до терапії. Сучасні дослідження свідчать, що ключову роль у формуванні чутливості пухлини до лікування відіграють не лише генетичний профіль пухлинних клітин, а й особливості пухлинного мікрооточення. Пухлинне мікрооточення є складною багатокомпонентною системою, до складу якої входять клітини стромы, імунні клітини, судинна мережа, позаклітинний матрикс, цитокіни, хемокіни та різноманітні регуляторні молекули. Саме взаємодія цих компонентів визначає проліферацію, інвазію, метастазування та розвиток лікарської резистентності. Останніми роками пухлинне мікрооточення розглядається як перспективне джерело біомаркерів прогнозу перебігу захворювання та предикції ефективності протипухлинної терапії. Ідентифікація молекулярних маркерів, пов'язаних із ремоделюванням позаклітинного матриксу, імунною відповіддю та міжклітинною комунікацією, відкриває нові можливості для створення алгоритмів прогнозування відповіді на хіміотерапію у хворих молодого віку та вдосконалення персоналізованих терапевтичних стратегій.

## РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

### 2.1. Клінічна характеристика хворих на РГЗ різних вікових груп

Дослідження ґрунтується на результатах клінічного та лабораторного обстеження 120 жінок, хворих на РГЗ II–III стадій, які проходили лікування на базі Національного інституту раку МОЗ України. Усі пацієнти, залучені до дослідження, дали інформовану згоду на використання клінічних даних у наукових цілях.

Згідно з даними історій хвороби, усім пацієнткам проведено загальні клінічні, біохімічні, лабораторні обстеження, ультразвукове дослідження (УЗД) органів черевної порожнини, мамографію, рентгеноскопію органів грудної порожнини, пункційну біопсію пухлин грудної залози за стандартами діагностики і лікування онкологічних хворих, затверджених наказами МОЗ України № 140 від 27.07.1998 р., № 554 від 17.09.2007 р., № 645 від 30.07.2010 р. та № 396 від 30.06.2015 р. Стадію пухлинного процесу визначали згідно з міжнародними класифікаціями пухлин (TNM, 8 видання (2016 р.)).

Зразки пухлинної тканини (біопсійний матеріал) отримували до проведення НПХТ. Залежно від клінічних показань усім хворим на РГЗ II–III стадії проводили НПХТ і органозберігаючі операції або радикальні мастектомії за Мадденом згідно зі стандартами лікування, затвердженими в Україні. Курси НПХТ включали 4 цикли за схемою AC (доксорубіцин 60 мг/м<sup>2</sup>, ендоксан 600 мг/м<sup>2</sup> – 1 день, кожен 21 день).

Ефективність НПХТ оцінювали через кожні 2 цикли за даними мамографії згідно з критеріями RECIST 1.1 [105]. Оцінка ступеня лікувального патоморфозу РГЗ у хворих молодого віку, що отримували лікування за схемою 4AC у неoad'ювантному режимі, оцінювалася за критеріями Miller-Payne [106].

Загальна характеристика хворих молодого віку до отримання НПХТ, які включені до дослідження, представлена у табл.2.1. Середній вік хворих у вибірці складав 57,2±3,6 р із коливаннями індивідуальних значень від 28 до 89 років. У 14 пацієнток була менопауза (23,4%), збережена менструальна функція у 46 хворих (76,6%).

Таблиця 2.1.

**Клініко-патологічна характеристика хворих на РГЗ**

Характеристики	≤ 45 років		> 45 років	
	N	%	N	%
Кількість пацієнтів	56	46.6	64	53.3
<b>Вік (років)</b>				
Середній вік	39.05±5.9		64.3±10.5	
Коливання віку	28-45		46-89	
<b>Стадія</b>				
II	20	35.7	20	31.2
III	36	64.3	44	68.8
<b>Категорія N відповідно до TNM</b>				
N0	36	64.3	40	62.5
N1	20	35.7	24	37.5
<b>Молекулярний підтип</b>				
Люмінальний А	16	28.7	16	25.0
Люмінальний Б	20	35.7	22	34.4
Her2/neu- позитивний	10	17.8	14	21.8
Потрійно негативний	10	17.8	12	18.8

Оцінка зміни пухлинної ніші є важливою характеристикою клінічної оцінки терапії раку: як зменшення пухлини (об'єктивна відповідь), так і прогресування захворювання є корисними кінцевими точками в клінічних дослідженнях. З моменту публікації RECIST у 2000 році багато дослідників, кооперативних груп, промислових та державних органів прийняли ці критерії для оцінки результатів лікування. Проте виникла низка питань і проблем, які призвели до розробки переглянутої настанови RECIST 1.1. Докази змін,

узагальнені в окремих статтях у цьому спеціальному випуску, отримані в результаті оцінки великого сховища даних (>6500 пацієнтів), досліджень моделювання та оглядів літератури.

Основні зміни включають: кількість уражень, які потрібно оцінити: на основі доказів із численних баз даних досліджень, об'єднаних у сховище даних для цілей аналізу, кількість уражень, необхідних для оцінки пухлинної ніші для визначення відповіді, було зменшено з максимум від 10 до максимум п'яти (і від п'яти до двох максимум на орган). Тепер включено оцінку патологічних лімфатичних вузлів: вузли з короткою віссю  $\geq 15$  мм вважаються вимірюваними та оцінюваними як цільові ураження.

Вимірювання короткої осі повинно бути включене до суми уражень при розрахунку відповіді пухлини. Вузли, які зменшуються до  $< 10$  мм короткої осі, вважаються нормальними. Підтвердження відповіді потрібне для досліджень із первинною кінцевою точкою відповіді, але більше не вимагається в рандомізованих дослідженнях, оскільки контрольна група служить відповідним засобом інтерпретації даних. Прогресування захворювання уточнюється в кількох аспектах: на додаток до попереднього визначення прогресування цільової хвороби на 20%, тепер також вимагається абсолютне збільшення на 5 мм [15].

Залежно від ступеня вираженості клінічного ефекту неoad'ювантного лікування проведено розподіл пацієнтів згідно з критеріями RECIST 1.1. (табл. 2.2). Пухлини хворих на РГЗ з повною або частковою регресією за критеріями RECIST 1.1. Ми відносили до чутливих. Пухлини, що відповідали на НХПТ стабілізацією або прогресуванням за тими ж критеріями, відносили до резистентних.

Таблиця 2.2.

**Розподіл РГЗ за чутливістю до неоад'ювантної поліхіміотерапії за  
схемою 4АС відповідно до критеріїв RECIST 1.1.**

Клінічна оцінка НПХТ	≤ 45 років		> 45 років	
	N (56)	% (100)	N (64)	% (100)
Повна відповідь	6	10.7	9	14.1
Часткова відповідь	17	30.4	18	28.1
Стабілізація	18	32.1	21	32.8
Прогресування	15	26.8	16	25.0

Ступінь лікувального патоморфозу за Miller-Payne оцінювали за наступними критеріями:

I: малопомітні зміни окремих пухлинних клітин, але без зменшення їхньої кількості

II: незначне зменшення кількості інвазивних пухлинних клітин, але в цілому клітинність залишається високою, зменшення кількості до 30%

III: скорочення числа пухлинних клітин до від 30 до 90%

IV: помітне зникнення пухлинних клітин так, що залишаються лише невеликі скупчення або широко розсіяні окремі клітини; більше 90% втрати пухлинних клітин

V: немає визначених інвазивних клітин у секційних зрізах з місця розташування первинної пухлини [90].

Відповідно до вищезазначених характеристик хворих із критеріями I–III було розподілено до нечутливих, тоді як пухлини із критеріями IV–V визначали як чутливі до НПХТ. У табл. 2.3. представлено розподіл вибірки хворих за критеріями Miller-Payne.

Таблиця 2.3.

**Розподіл РГЗ за ступенем лікувального патоморфозу після неoad'ювантної поліхіміотерапії за схемою 4АС за критеріями Miller-Payne**

Клінічна оцінка НПХТ	≤ 45 років		> 45 років	
	N (56)	% (100)	N (64)	% (100)
I	4	7.1	6	9.4
II	8	14.3	7	10.9
III	17	30.4	21	32.8
IV	15	26.8	16	25.0
V	12	21.4	14	21.9

## **2.2. Кількісна полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі**

Для дослідження експресії мікроРНК на клінічному матеріалі хворих було застосовано метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) в реальному часі.

З пухлинної тканини, залитої в парафінові блоки, а також з сироватки крові виділяли тотальну РНК за допомогою комерційного набору “RNeasy FFPE Kit” (QIAGEN, Німеччина).

Кількість виділеної РНК визначали на спектрофотометрі “NanoDrop 2000c Spectrophotometer” (Thermo Scientific, США). Чистоту виділеної РНК контролювали, використовуючи співвідношення величин оптичного поглинання при довжинах хвиль 260 та 280 нм. РНК розчиняли у Tris-EDTA буфері та до проведення ПЛР зберігали при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Для визначення мікроРНК використовували окремий stem-loop праймер для синтезу кДНК та універсальний reverse primer 5'- GTGCAGGGTCCGAGGT-3', відповідно до методики stem-loop miRNA зворотньоотранскрипційної ПЛР [107] з використанням модифікованої методики для комерційного набору LunaScript™ RT SuperMix (New England, США) (табл. 2.4.).

Таблиця 2.4.

**Склад реакційної суміші для проведення зворотньоотранскрипційної  
ПЛР**

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

Послідовності праймерів для виявлення мікроРНК були отримані за допомогою ресурсу <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/> та синтезовані компанією Metabion, Німеччина (табл. 2.5.).

Таблиця 2.5.

**Послідовності праймерів для оцінки експресії мРНК та мікроРНК в  
пухлинній тканині хворих на рак грудної залози**

мікроРНК	stem-loop праймер	forward праймер
мікроРНК-26b-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACCAGA GCCAAC TCGTGA	3'-GTTTGGGTTCAA GTAATTCAGG-5
мікроРНК-186-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGT CCGAGGTATTCGCACCAGA GCCAAC TCGTGA	3'- GTTTGCTTGTAAC TTCCAA-5

До продукту реакції додавали суміш реагентів (табл. 2.6.) і проводили ПЛР у реальному часі за заданими умовами (табл. 2.7.).

Як ендogenous контроль використовували мікроРНК RNU48. Послідовності праймерів взяті з ресурсу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> та синтезовані компанією Metabion, Німеччина: RT-праймер: 5'-CTCTGACC-3', forward 5'-AGTGATGATGACCCCAGGTAАСТС-3', reverse 5'-СТGCGGTGATGGCАТCAG-3'. Відносну експресію мікроРНК було визначено порівняльним dCT-методом (у.о.).

Таблиця 2.6.

### Склад реакційної суміші для ПЛР

Компонент реакційної суміші	Кількість на 20 мкл реакційної суміші
2x-універсальна суміш Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X), ThermoScientific, USA	10,00
Вода, очищена від нуклеаз	4,00
20x суміш forward та reverse праймерів для мікроРНК	1,00
кДНК	5,00
Всього	20,00

Таблиця 2.7.

### Умови проведення ПЛР (кількість зразка – 20 мкл)

Крок	Активація білка	Полімеразна ланцюгова реакція	
	HOLD	Цикл (40 циклів)	
		Денатурація	Подовження ланцюга
Час	10 хв	15 с	60 с
Температура (0C)	95	95	60

Середнє для триплікатів граничне значення циклу (Ct) досліджуваної мікроРНК нормалізували відносно Ct ендogenous контролю (далі - у.о.) [108].

Зміну експресії мікроРНК в певну кількість разів порівняно з контролем обчислювали за формулами  $2^{-\Delta Ct}$ . Результати обробляли в програмі Microsoft Excel і представляли у графічному вигляді.

### **2.3. Імуногістохімічний аналіз експресії CXCL13**

Для оцінки експресії CXCL13 у тканині РГЗ використовували гістологічні зрізи (товщина 5–7 мкм) парафінових блоків біопсійного матеріалу.

Першим етапом імуногістохімічної реакції була депарафінізація гістологічних зрізів. Для демаскування антигенів скельця зі зрізами поміщали у EDTA-буфер (рН 6,0) на водяну баню (Biosan WB-4MS, Латвія) на 20 хв. Імуногістохімічне дослідження експресії молекулярних маркерів проводилося із застосуванням Ultra Vision LP Detection System фірми Thermo Scientific (США) відповідно до протоколу виробника. Для детекції антигена використовували анти-CXCL13 антитіла (RTU, клон ІНС551, GeneAb, Канада).

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

У якості позитивного контролю використовували препарати зі зрізами тканин, у яких було виявлено високий рівень експресії маркеру. Негативним контролем були зрізи пухлин грудної залози, на які не наносили моноклональні антитіла.

Оцінку результатів імуногістохімічних реакцій проводили за допомогою світлового мікроскопу Axio Scope A1 (“Carl Zeiss”, Німеччина), при збільшенні  $\times 200$ . Результати виражали у відсотках, які розраховували шляхом підрахунку кількості CXCL13-позитивних клітин на 1000 проаналізованих клітин у кожному випадку.

### **2.4. Біоінформатичний аналіз**

Ідентифікацію генів-мішеней досліджуваних мікроРНК проводили на основі аналізу інформації, розміщеної в базі даних TarBase v.8.0

(<http://www.microrna.gr/tarbase>) та інтегрованої в онлайн-інструмент miRNet v2.0 (<https://www.mirnet.ca>). miRNet – це веб-платформа, призначена для з'ясування функцій мікроРНК шляхом інтеграції даних користувачів із наявними даними за допомогою візуальної аналітики на основі мережі [109]. TarBase v.8.0 – база даних, що містить інформацію щодо експериментально встановлених мішеней мікроРНК у 18 видів організмів, у тому числі і в Homo sapiens [110].

Дослідження особливостей експресії мікроРНК в тканині РГЗ залежно від клініко-патологічних особливостей новоутворень проведене з використанням ресурсу The University of ALabama at Birmingham CANcer Data Analysis Portal - UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>). UALCAN –база даних, що містить інформацію про рівні експресії генів, мікроРНК, довгих некодуючих РНК, метилювання промоторної ДНК у пухлинній тканині при 33 типах раку з The Cancer Genome Atlas та ін. [111].

Оцінку залежності показників загальної виживаності від рівнів експресії досліджуваних мікроРНК проводили із використанням ресурсу KM-Plotter [112].

## **2.5. Статистичний аналіз**

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою математичної програми медико-біологічної статистики GraphPad Prism v.8.0 (GraphPad Software Inc., США). Були використані наступні статистичні методи: стандартний описовий і непараметричний. Порівняння достовірності відмінностей середніх величин проводили з використанням Т-критерію Стьюдента або U-критерію Манна — Уїтні залежно від характеру розподілу вибірки. Достовірними вважали розбіжності при  $p < 0,05$ .

### **РОЗДІЛ 3. РЕТРОСПЕКТИВНЕ ДОЛІДЖЕННЯ КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ У ХВОРИХ РІЗНИХ ВІКОВИХ ГРУП ЗАЛЕЖНО ВІД МОЛЕКУЛЯРНОГО ПІДТИПУ НОВОУТВОРЕНЬ**

Загалом для аналізу залучено інформацію про перебіг захворювання 544 хворих. У дослідженні проаналізовано дані 76 жінок віком до 40 років та 97 пацієнток, старших за 55 років із РГЗ люмінального А, 108 жінок віком до 40 років та 101 пацієнток, старших за 55 років із РГЗ люмінального Б підтипу, 33 та 56 хворих на РГЗ HER2/neu позитивного молекулярного підтипу до 40 та старших за 55 років відповідно, а також 27 хворих до 40 років і 56 пацієнток віком від 55 років із РГЗ потрібно негативного молекулярного підтипу. Усі хворі отримували лікування в Національному інституті раку впродовж 2021-2024 років (Таблиця 3.1.). Усіх пацієнтів лікували за стандартизованою схемою AC (доксорубіцин 60 мг/м<sup>2</sup> та циклофосфамід 600 мг/м<sup>2</sup> кожні 14 днів) з подальшим переходом на щотижневе введення паклітакселу 80 мг/м<sup>2</sup>. Результати оцінювали за допомогою комп'ютерної томографії (RECIST 1.1) до початку передопераційного курсу та після нього. Ступінь лікувального патоморфозу пухлини оцінювали за шкалою Міллера — Пейна.

Клініко-морфологічний аналіз виявив суттєві вікові відмінності. Регіонарне ураження лімфатичних вузлів (N1–N2) суттєво частіше спостерігалось у жінок молодшого віку із РГЗ люмінального Б підтипу. Зокрема, серед пацієнток до 40 років 71% (n=77) мали метастатичне ураження регіонарних лімфатичних вузлів. З них у 61 жінки (56,5%) діагностовано N1 (метастази в 1–3 лімфатичних вузлах), а у 16 (14,8%) — N2 (ураження  $\geq 4$  лімфатичних вузлів). Без ознак ураження (N0) у вибірці зафіксовано 31 пацієнтка (28,7%). Водночас навпаки більша частка хворих без ураження регіонарних лімфатичних вузлів була притаманна для хворих із люмінальним А (57,9% та 57,7% відповідно для хворих молодших за 40 та старших за 55 років відповідно) та HER2/neu позитивним (54,5% та 60,7% відповідно для хворих молодших за 40 та старших

за 55 років відповідно) молекулярним підтипом. У пацієнок молодого віку із РГЗ потрійно негативного підтипу частка хворих із діагностованими метастазами до лімфатичних вузлів була більшою порівняно із хворими старшого віку та становила 51,9% та 43,5% відповідно.

При цьому розміри пухлинного утворення були меншими у молодих пацієнок із люмінальними А та Б молекулярними підтипами: категорії T1–T2 виявлено 46 (60,5%) та 69 (65,7%) жінок відповідно, тоді як у контрольній групі хворих із РГЗ, старших за 55 років — у 39 (40,2%) та 49 (49,5%) жінок відповідно. Натомість T3–T4 пухлини були частішими у старших жінок (у 59,7% та 51,5% у хворих люмінального А та Б молекулярних підтипів), що може бути пов'язано із менш агресивною біологією пухлин або з тим, що у старшій когорті діагноз частіше встановлювався на етапі безсимптомного перебігу під час скринінгу.

Водночас у хворих старшого віку із HER2/neu-позитивним молекулярним підтипом навпаки спостерігали вищу частку хворих категорії T1–2: 37 (66,1%) пацієнок проти 23 (22,8%) у когорті до 40 років. У пацієнок потрійнонегативного молекулярного підтипу відмічено розподіл, схожий до пацієнок люмінального Б молекулярного підтипу: в обох вікових групах частка новоутворень грудної залози меншого розміру категорій T1-2 превалювала та становила 16 (59,3%) і 29 (63,0%) жінок для віку до 40 та старших за 55 років відповідно.

У люмінальному А підтипі незалежно від віку домінували пухлини G2. Серед пацієнок молодших за 40 років частка G2 становила 76,3% (58 випадків) проти 23,7% (18 випадків) для G3. Аналогічна тенденція зберігалася і у групі старших за 55 років: G2 — 75,3% (73 випадки), G3 — 24,7% (24 випадки). Таким чином, для люмінального А підтипу характерне чітке переважання помірною ступеня диференціювання незалежно від віку.

Таблиця 3.1.

**Клінічна характеристика хворих на РГЗ різних вікових груп залежно від молекулярного підтипу новоутворення.**

Показник	Люмінальний А				Люмінальний Б				HER2/neu позитивний				Потрійнонегативний			
	Хворі до 40 років		Хворі 55+ років		Хворі до 40 років		Хворі 55+ років		Хворі до 40 років		Хворі 55+ років		Хворі до 40 років		Хворі 55+ років	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Кількість пацієнтів</b>	76		97		108		101		33		56		27		46	
<b>Регіонарне ураження ЛВ (N1–N2)</b>	32	42,1	41	42,3	77	71,3	60	55,6	15	45,5	22	39,3	14	51,9	20	43,5
<b>- N1 (1–3 ЛВ)</b>	29	38,2	35	36,1	61	56,5	47	46,5	9	27,3	16	28,6	11	40,7	16	34,8
<b>- N2 (≥4 ЛВ)</b>	3	3,9	6	6,2	16	14,8	13	9,1	6	18,2	6	10,7	3	3,8	4	8,7
<b>Без ураження ЛВ (N0)</b>	44	57,9	56	57,7	31	28,7	41	44,5	18	54,5	34	60,7	13	48,1	26	56,5
<b>T1–T2 пухлини</b>	46	60,5	39	40,2	69	65,7	49	49,5	23	22,8	37	66,1	16	59,3	29	63,0

<b>T3–T4 пухлини</b>	30	39,5	58	59,7	39	36,1	52	51,5	10	77,2	19	43,9	11	40,7	17	37,0
<b>G3 (низька диференціація)</b>	18	23,7	24	24,7	73	67,6	45	45	13	39,4	19	33,9	11	40,7	34	73,9
<b>G2 (помірна диференціація)</b>	58	76,3	73	75,3	35	32,4	56	55	20	60,6	37	76,1	18	59,3	12	28,1
<b>Медіана Ki-67 (%)</b>	12,1		9,7		45,6		32,8		34,8		28,4		44,8		39,1	
<b>Медіана ER (%)</b>	56		74		35		65		-		-		-		-	

За ступенем гістологічної диференціації у молодих хворих люмінального Б підтипу переважали низькодиференційовані пухлини (G3) — у 73 жінок (68%), тоді як G2 зафіксовано у 35 випадках (32%). У старших за віком хворих ситуація була зворотною: G2 аденокарциному грудної залози діагностували у 56 пацієток (55%), а G3 — у 45 (45%). Це свідчить про переважання агресивніших морфологічних форм неоплазій цього молекулярного підтипу саме у молодому віці.

У HER2-позитивному підтипі виявлено вікові відмінності: серед пацієток до 40 років переважали пухлини G2 — 60,6% (20 випадків) проти 39,4% (13 випадків) G3. Натомість у групі старших за 55 років спостерігалось чітке домінування G2 — 66,1% (37 випадків) порівняно з 33,9% (19 випадків) G3, що вказує на відносно вищу частку помірно диференційованих пухлин у цьому підтипі.

Агресивний профіль продемонстрував також і базальний підтип. У молодших пацієток частка G3 становила 40,7% (11 випадків) проти 59,3% (18 випадків) G2, тоді як у групі старших за 55 років відзначено різке зростання частки низькодиференційованих пухлин — 73,9% (34 випадки) G3 проти лише 28,1% (12 випадків) G2. Це підтверджує асоціацію базального підтипу з низьким ступенем диференціювання, особливо у старшій віковій групі.

Аналіз проліферативної активності пухлин за індексом Ki-67 показав виражені відмінності між молекулярними підтипами та віковими групами. Найнижчі значення Ki-67 спостерігалися у люмінальному А підтипі: медіана становила 12,1% у пацієток молодших за 40 років та 9,7% у групі старших за 55 років, що відповідає низькій проліферативній активності цього підтипу.

Проліферативна активність, визначена за індексом Ki-67, також була достовірно вищою у молодих пацієток люмінального Б підтипу: середній рівень — 45,6% (95% ДІ: 42,3–49,1) проти 32,8% (95% ДІ: 30,1–35,5) у старших хворих ( $p < 0,01$ ). Ki-67  $> 35\%$  мали 78 (72%) жінок до 40 років та 50 (50%) жінок 55+ років ( $p < 0,05$ ), що додатково вказує на вищу біологічну активність пухлин у молодшій віковій групі пацієток із РГЗ.

У HER2-позитивному підтипі значення Ki-67 також залишалися високими — 34,8% у пацієток до 40 років та 28,4% у старших за 55 років, що свідчить про активний клітинний поділ незалежно від віку.

Найвищі показники проліферації відзначено при базальному підтипі: медіана Ki-67 становила 44,8% у молодших пацієток та 39,1% у старшій віковій групі, що узгоджується з високою агресивністю цього варіанту РГЗ.

Оцінка експресії ER проводилася лише для люмінальних підтипів. У люмінальному А підтипі медіана ER становила 56% у молодших пацієток і 74% у старших, що вказує на більш виражену гормональну залежність пухлин у старшому віці. У люмінальному Б підтипі відповідні значення становили 35% у групі до 40 років та 65% у групі старших за 55 років, демонструючи нижчий рівень гормональної експресії у молодих пацієток та зростання ER-позитивності з віком.

Важливо зазначити, що шлях до встановлення діагнозу також мав вікову специфіку. У групі жінок 55+ років, 52,5% були виявлені під час рутинного мамографічного скринінгу, що сприяло виявленню пухлин на ранніх етапах. У молодшій когорті лише 20,4% пройшли обстеження в межах скринінгу, тоді як решта (понад 79%) звернулася через наявність симптомів — пальповане утворення, біль або зміни форми грудної залози. Це частково пояснює вищу частоту ураження лімфатичних вузлів та більшу агресивність процесу у молодих жінок.

Таким чином, у пацієток до 40 років люмінального Б молекулярного підтипу частіше фіксуються пухлини з вищою проліферативною активністю, нижчим ступенем диференціювання, більшою частотою ураження регіонарних лімфатичних вузлів і нижчим рівнем гормональної чутливості, що комплексно вказує на більш агресивний біологічний перебіг навіть у межах ER/PR-позитивного люмінального Б підтипу.

Об'єктивну відповідь на лікування за системою RECIST 1.1 оцінювали на основі даних комп'ютерної томографії, включаючи стабілізацію, часткову та повну відповідь.

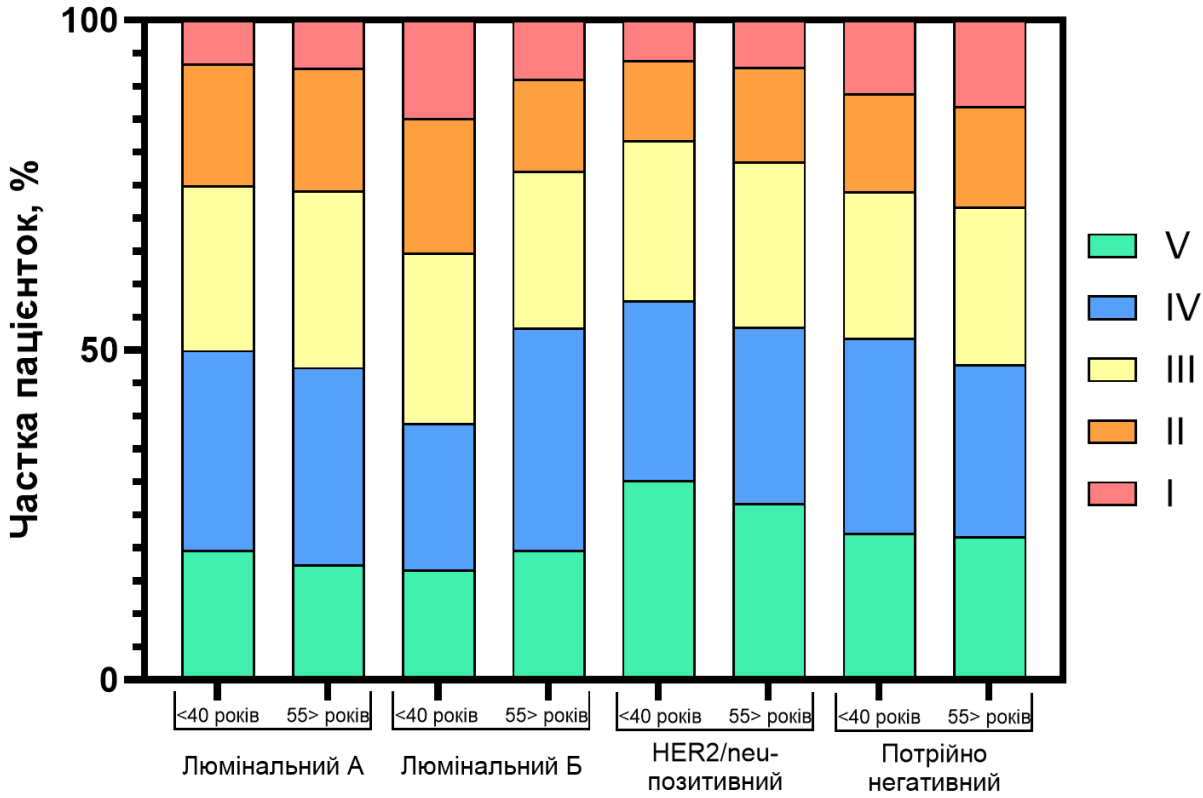
У групі до 40 років часткова відповідь спостерігалася у 51 жінки, повна відповідь – у 22, стабілізація – у 33, а прогресування хвороби – у 2 пацієнток. У старшій групі часткова відповідь зафіксована у 42 жінок, стабілізація – у 49, а повна відповідь – у 10 жінок ( $p < 0,05$ ).

У нашому дослідженні спостерігалася, що у молодих жінок (до 40 років) частота IV і V ступеня патоморфозу (рис. 3.1) була вищою порівняно з групою старших жінок. Це свідчить про кращу відповідь на неoad'ювантну хіміотерапію в молодшій групі. Водночас, слід зазначити, що повна патоморфологічна відповідь за даними післяопераційного гістологічного аналізу не завжди відповідала повній відповіді за даними комп'ютерної томографії (КТ). У 12 пацієнток молодшої групи, у яких було підтверджено повний патоморфоз, за даними КТ спостерігалася лише часткова відповідь або стабілізація захворювання згідно RECIST 1.1.

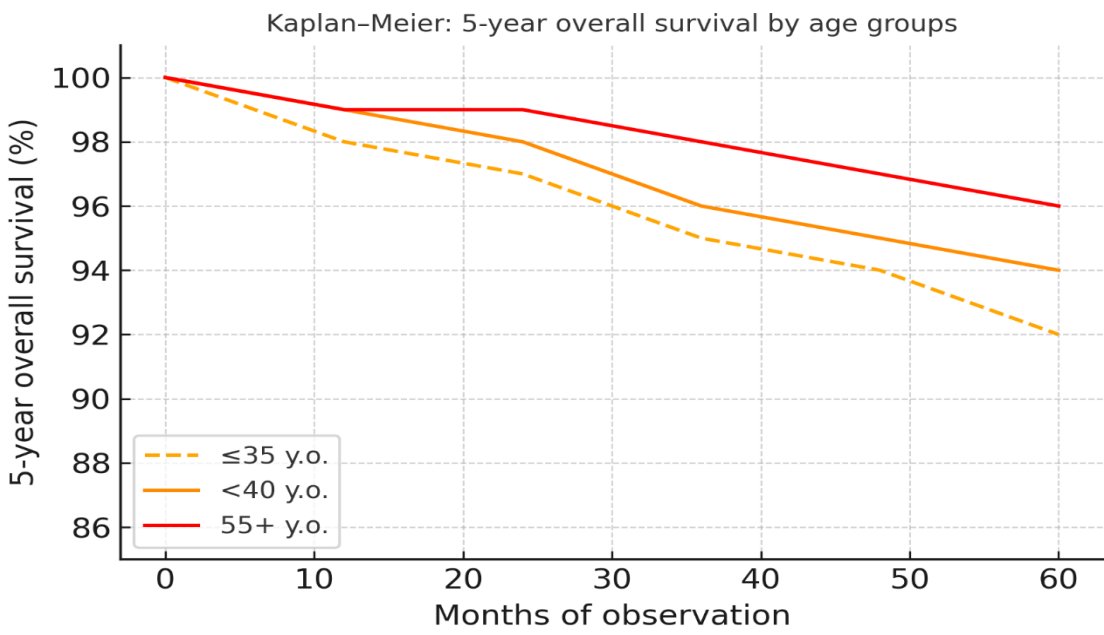
Варто зазначити, що найвища частка чутливих до НПХТ за схемою 4AC зафіксована у хворих на РГЗ HER2/neu-позитивному підтипі молодого віку. Водночас отримані нами дані для Люмінального Б підтипу були близькими до аналогічних результатів у групі хворих молодого віку із РГЗ потрійнонегативного молекулярного підтипу.

З урахуванням отриманих даних, в подальшому нами було проведено оцінку виживаності хворих. Загальна виживаність (Рис.3.2.) у молодій групі (до 40 років) становила 93,5% (зафіксовано 16 (6,5%) випадків смерті, спричинених діагнозом РГЗ), тоді як у старшій групі значення загальної виживаності становили 97,0% ( $p < 0,05$ ) (9 (2,9%) зафіксованих випадки смерті, спричинені діагнозом РГЗ).

Водночас при виділенні підгрупи дуже молодих жінок (до 35 років) показано, що такі хворі мали достовірно нижчі показники загальної виживаності на рівні 87,8% ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 3.1.** Розподіл хворих за ступенем лікувального патоморфозу за Miller-Raune в досліджуваних підгрупах



**Рис. 3.2.** Криві загальної виживаності пацієнтів з РГЗ різних вікових підгруп.

П'ятирічна безрецидивна виживаність була достовірно нижчою у молодих жінок (рецидив діагностовано у 43 з 244 пацієток (17,6%)). Так, у хворих молодого віку вона становила 82,4%, тоді як у старшій групі цей показник був на рівні 94,3% ( $p < 0,05$ ) (17 із 101 (5,7%) із рецидивом, діагностованим впродовж 5 років після діагностування РГЗ). Це підтверджує припущення про вищу агресивність пухлинного процесу та потребу в персоналізованому підході до лікування саме у когорті молодих жінок із РГЗ.

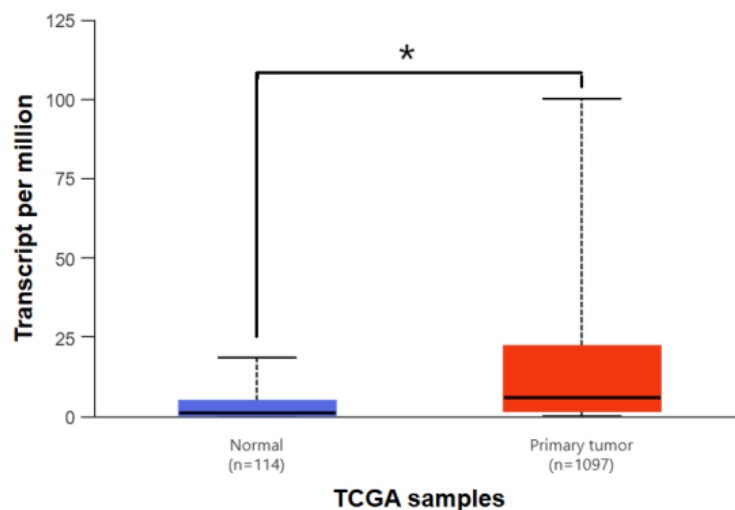
Результати проведених досліджень в розділі 3, опубліковано у [127, 130-136].

## РОЗДІЛ 4. ВІКОВІ ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ *CXCL13* У ТКАНИНІ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ ПРОГНОСТИЧНЕ І ПРЕДИКТИВНЕ ЗНАЧЕННЯ

### 4.1. Дослідження особливостей експресії *CXCL13* у тканині РГЗ в системі *in silico*

#### 4.1.1. Аналіз показників експресії *CXCL13* на рівні мРНК та білка у тканині РГЗ із використанням бази даних UALCAN

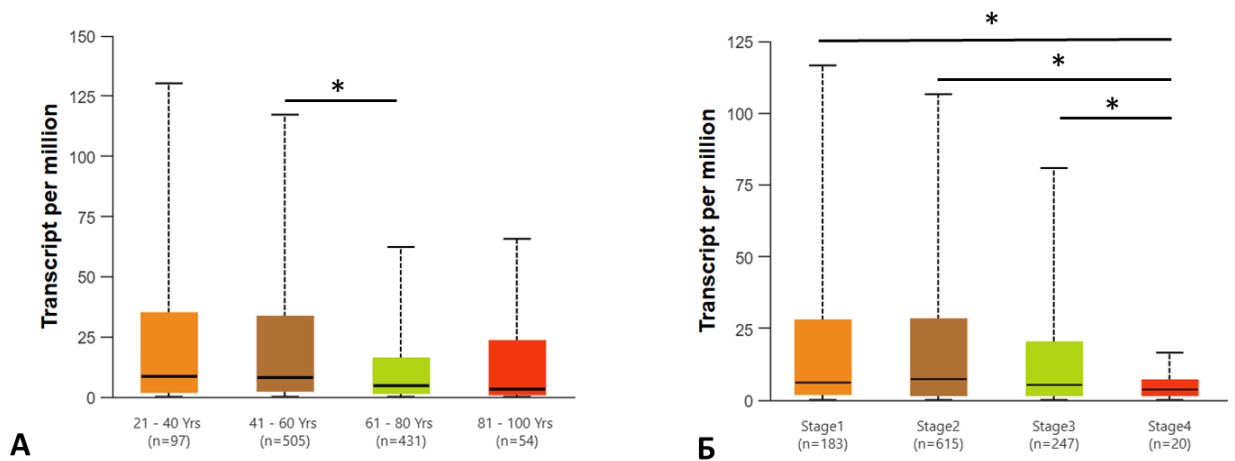
Проведений біоінформатичний аналіз рівнів мРНК, на основі онлайн-ресурсу UALCAN показав, що розвиток злоякісних новоутворень у грудній залозі супроводжується збільшенням експресії *CXCL13*. Як видно з даних, наведених на рис. 4.1. у тканині РГЗ рівень мРНК *CXCL13* становив 6,003 TPM при індивідуальних коливаннях від 0 до 100,164 TPM, що майже в 6,5 раза ( $p < 0,05$ ) більше у порівнянні з нормальною тканиною грудної залози, де середній рівень зазначеного маркера складав 0,928 TPM з індивідуальними коливаннями від 0 до 18,172 TPM.



**Рис. 4.1.** Експресія мРНК *CXCL13* у нормальній та злоякісно трансформованій тканині грудної залози

\*  $p < 0,05$  – різниця показників достовірна

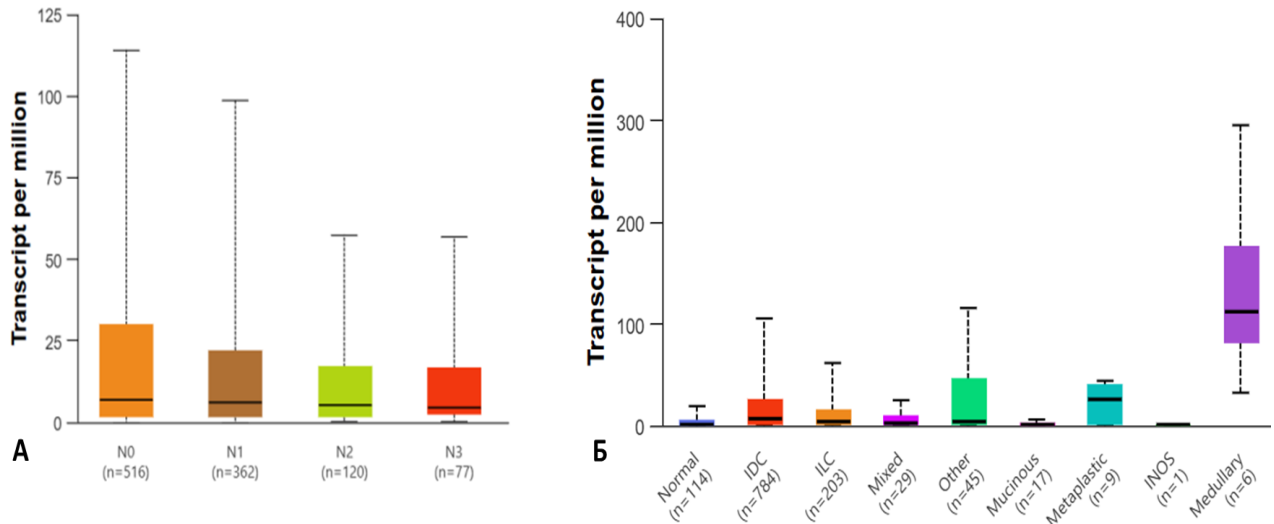
При аналізі зв'язку експресії гену *CXCL13* від клініко-патологічних особливостей РГЗ виявлено зв'язок рівня його білка від віку хворих та стадії пухлинного процесу (рис. 4.2.). Найнижчі рівні експресії мРНК *CXCL13* встановлено у тканині РГЗ хворих із 4 стадією пухлинного процесу порівняно з пацієнтками на ранніх стадіях РГЗ. Визначено, що рівні мРНК *CXCL13* хворих на РГЗ віком 41–60 років були у 1,8 раза вищими порівняно із показниками у групі пацієнток 61–80 років.



**Рис. 4.2.** Зв'язок показників експресії *CXCL13* на рівні мРНК у тканині РГЗ із віком пацієнток (А) та стадією пухлинного процесу (Б)

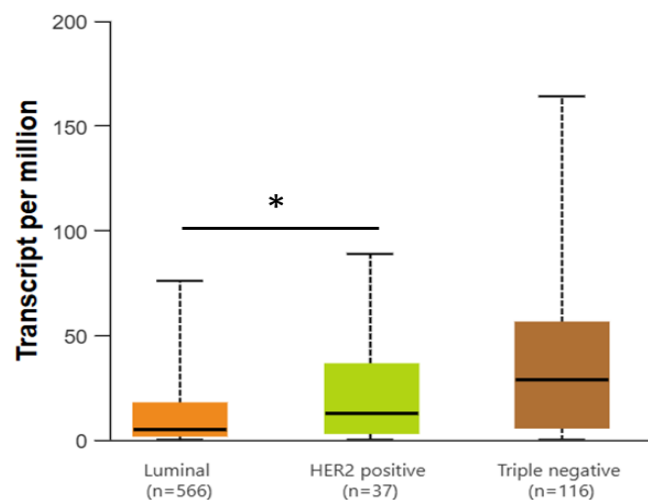
\*  $p < 0,05$  – різниця показників достовірна

Подальший аналіз показників експресії *CXCL13* на рівні мРНК не виявив зв'язку із наявністю метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах та гістологічним типом новоутворень.



**Рис. 4.3.** Зв'язок показників експресії *CXCL13* на рівні мРНК у тканині РГЗ із наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах (А) та гістологічним типом новоутворень (Б).

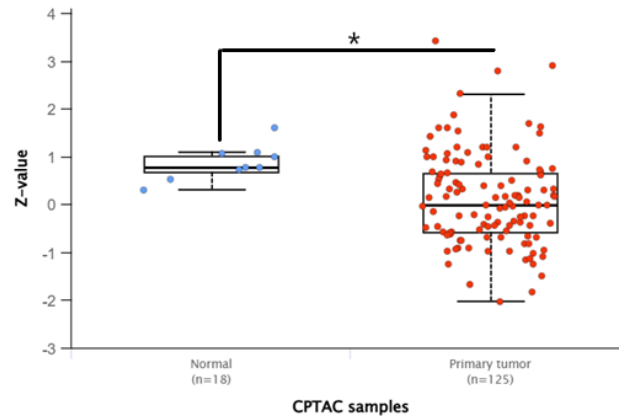
Продемонстровано, що найвищими показниками експресії мРНК *CXCL13* серед усіх досліджених молекулярних підтипів РГЗ характеризувалась пухлинна тканина РГЗ HER2/neu-позитивного молекулярного підтипу (рис.4.4.). Зокрема, Встановлено, що рівні мРНК *CXCL13* у тканині РГЗ люмінальних молекулярних підтипів становила 5,3 у.о. та була в 2,4 ( $p < 0,05$ ) рази нижчою порівняно із показниками у новоутвореннях HER2/neu – позитивного молекулярного підтипу (Me=12,63 у.о.).



**Рис. 4.4.** Експресія *CXCL13* на мРНК залежно від молекулярного підтипу РГЗ.

\*  $p < 0,05$  – різниця показників достовірна

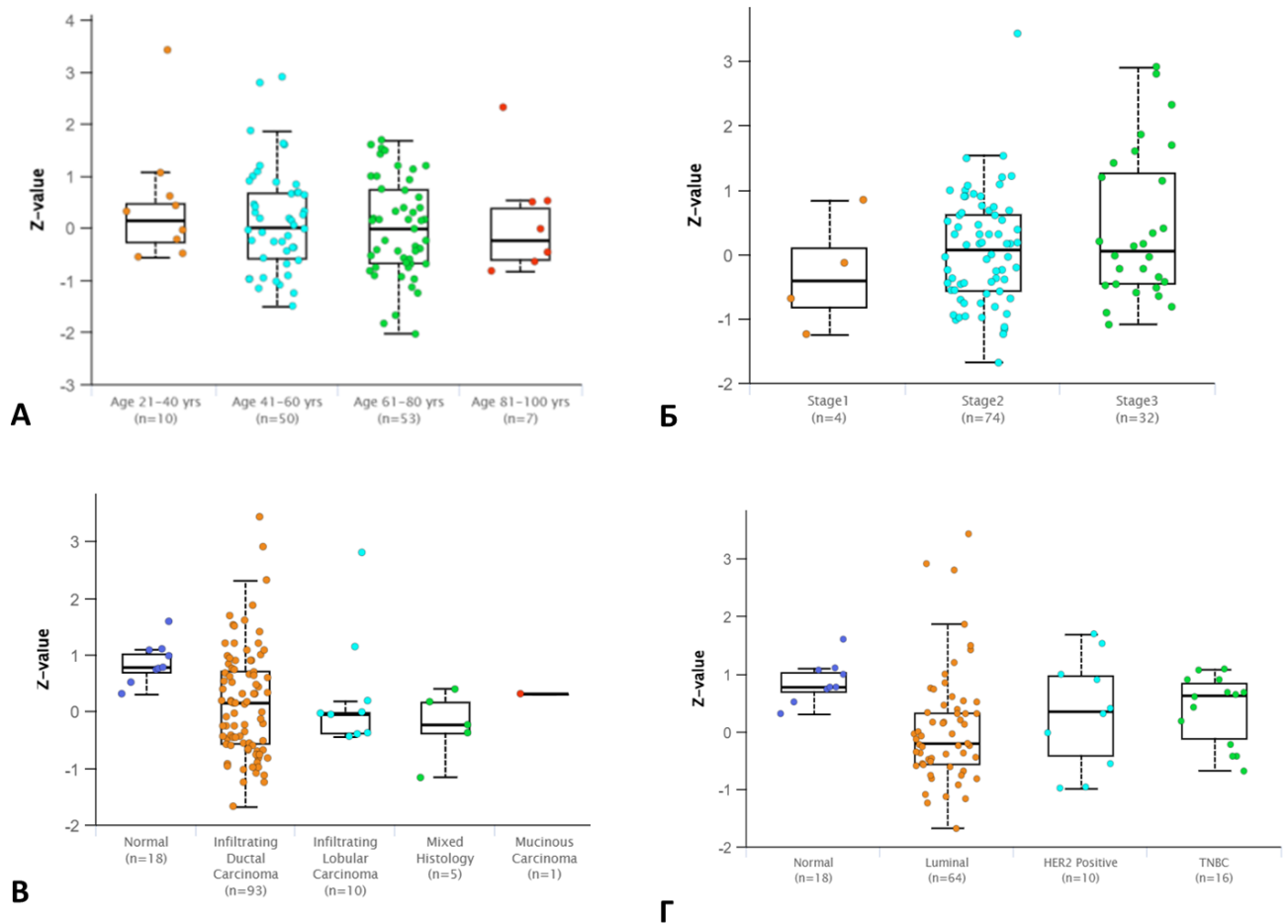
Аналіз показників експресії *CXCL13* на рівні білка (рис. 4.5) продемонстрував, що тканина РГЗ характеризується суттєво нижчими показниками даного хемокіну ( $p = 1,2e^{-4}$ ) порівняно із нетрансформованою тканиною грудної залози.



**Рис. 4.5.** Експресія *CXCL13* на рівні білка у нормальній та злоякісно трансформованій тканині грудної залози.

\*  $p < 0,05$  – різниця показників достовірна

Надалі аналіз показників експресії *CXCL13* на рівні білка проводили залежно від основних клініко-патологічних характеристик хворих на РГЗ. Як видно з рис. 4.6 не визначено залежності показників експресії *CXCL13* на рівні білка від віку, стадії пухлинного процесу, гістологічного типу новоутворень та молекулярного підтипу РГЗ. На рівні тенденції спостерігається зростання рівня *CXCL13* в тканині РГЗ із підвищенням стадії пухлинного процесу. Варто зауважити, що даний аналіз виконаний на невеликій вибірці, що може впливати на результат.

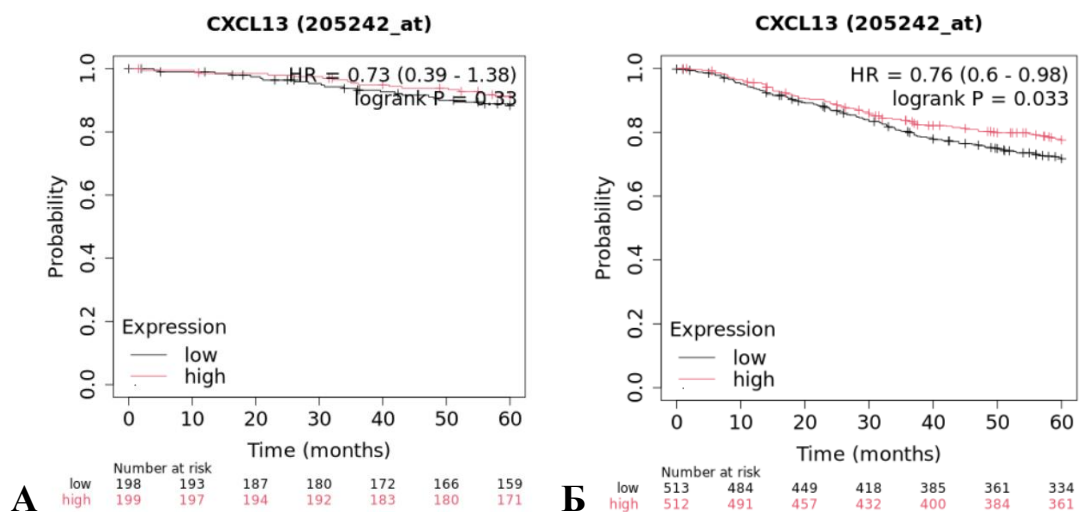


**Рис. 4.6.** Зв'язок показників експресії *CXCL13* на рівні білка у тканині РГЗ і основних клініко-патологічних характеристик РГЗ (А — віку пацієток; Б — стадії пухлинного процесу; В — гістологічного типу новоутворень; Г — молекулярного підтипу).

Таким чином, результати проведеного нами аналізу відкритих баз даних свідчать, що розвиток злоякісного процесу у грудній залозі супроводжується суттєвим зростанням експресії *CXCL13* на рівні мРНК та її зменшенням на рівні білка. Отримані дані вказують на перспективність використання показників експресії *CXCL13* на рівні мРНК з метою прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу.

#### 4.1.2. Аналіз показників безрецидивної та загальної виживаності хворих на РГЗ залежно від експресії *CXCL13* на рівні мРНК та білка із використанням бази даних Kaplan-Meier Plotter

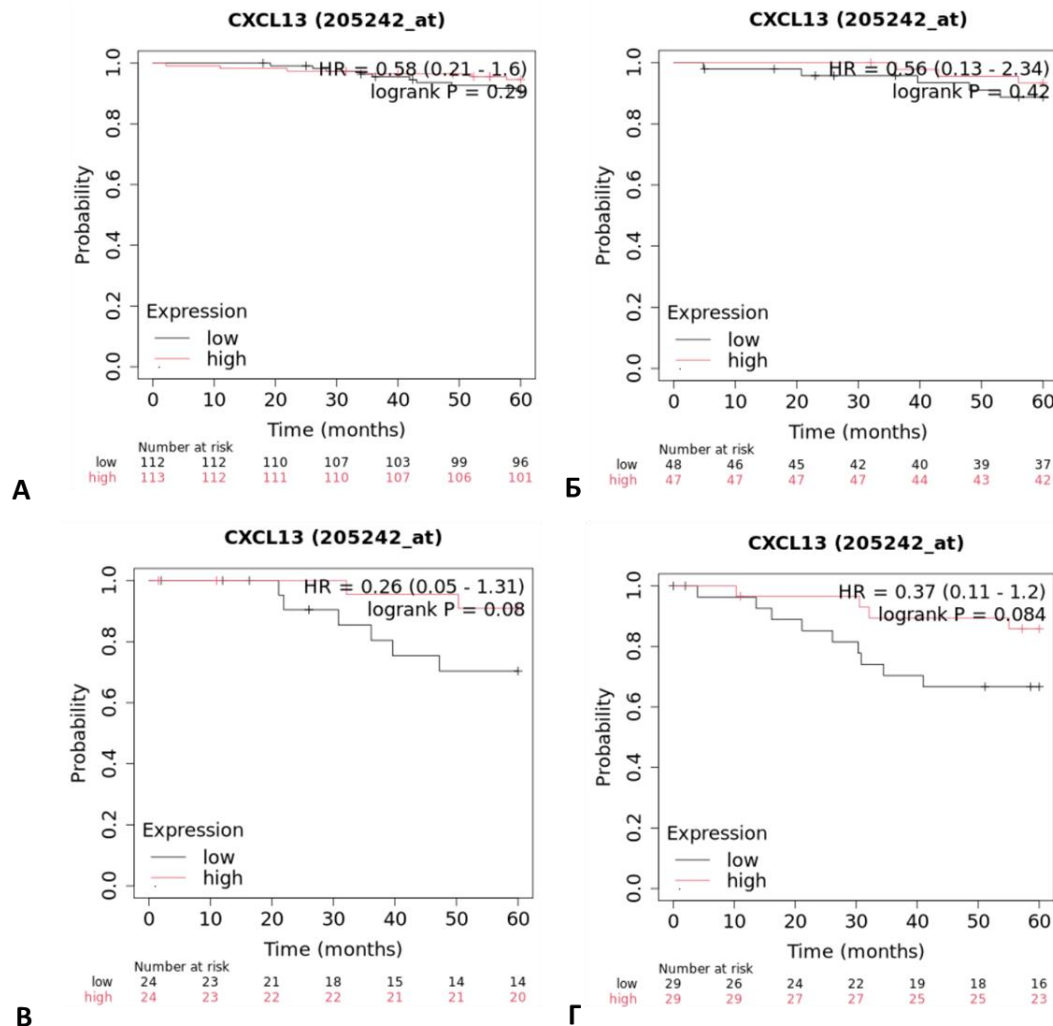
Проведено аналіз показників загальної (рис. 4.7. (А)) та безрецидивної (рис. 4.7. (Б)) виживаності хворих на РГЗ залежно від рівня мРНК *CXCL13* із використанням бази даних Kaplan-Meier Plotter. Встановлено, що 5-річна безрецидивна виживаність хворих на РГЗ із високим рівнем експресії мРНК *CXCL13* була на 5% ( $p < 0,05$ ) більшою у порівнянні із пацієнтами із низьким рівнем мРНК цього хемокіну у пухлинній тканині. Не виявлено зв'язку між рівнями мРНК *CXCL13* у пухлинній тканині та показниками загальної виживаності хворих на РГЗ.



**Рис. 4.7.** Показники загальної (А) та безрецидивної (Б) виживаності залежно від експресії *CXCL13* на рівні мРНК в тканині РГЗ

У подальшому було проведено аналіз показників загальної (Рис. 4.8.) та безрецидивної (Рис. 4.9.) виживаності хворих на РГЗ залежно від рівня експресії мРНК *CXCL13* з урахуванням молекулярного підтипу пухлин. Статистично значущого зв'язку між рівнем *CXCL13* у пухлинній тканині та 5-річною загальною виживаністю пацієнток із різними молекулярними підтипами РГЗ не

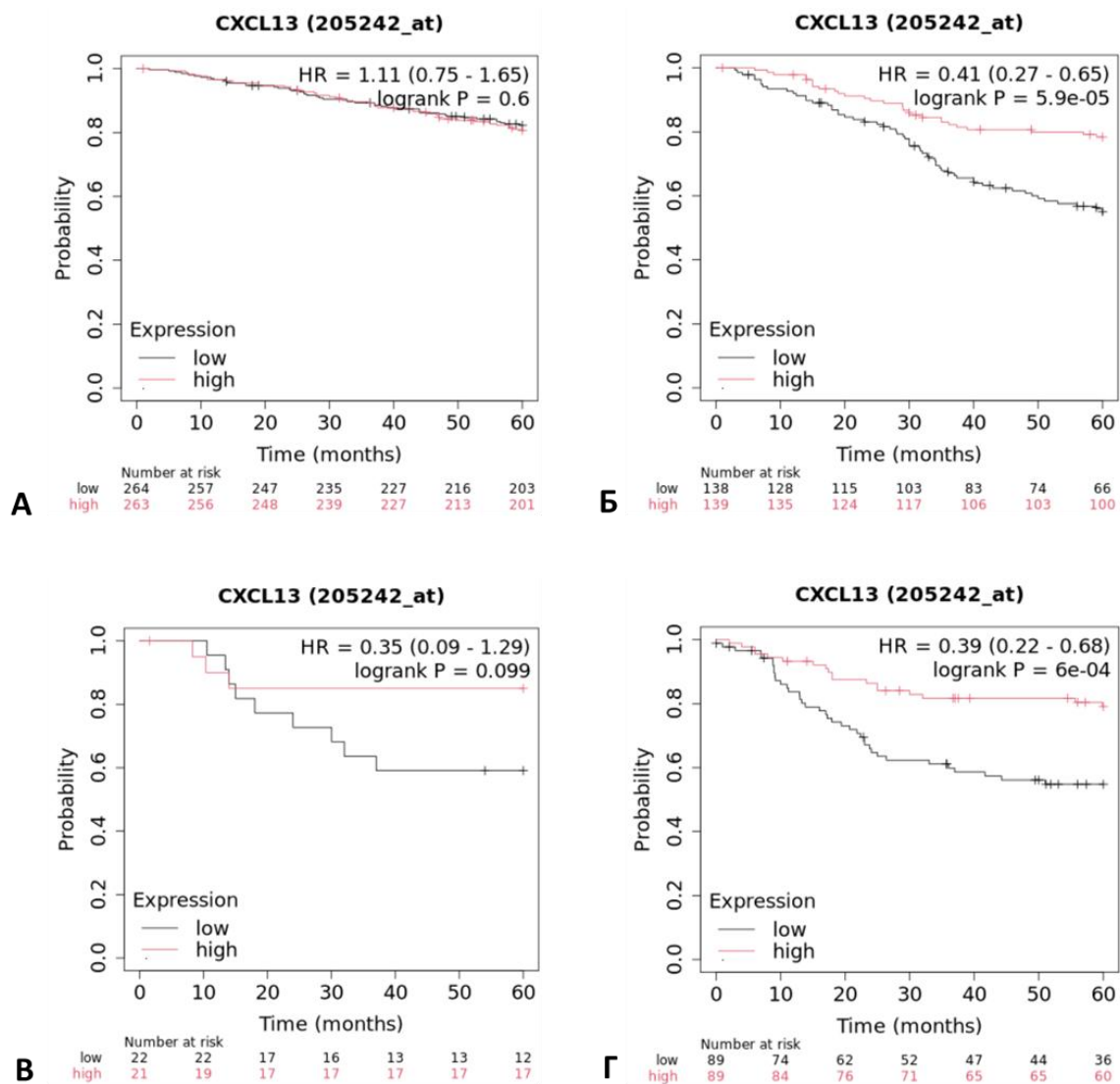
встановлено. Водночас отримані результати демонструють чітку тенденцію до того, що підвищена експресія *CXCL13* може асоціюватися з більш сприятливим клінічним перебігом та зниженням ймовірності розвитку рецидиву.



**Рис. 4.8.** Показники загальної виживаності залежно від експресії *CXCL13* на рівні мРНК в тканині РГЗ різних молекулярних підтипів: А – Люмінальний А, Б – Люмінальний Б, В – HER2/неу-позитивний, Г – Базальний.

Продемонстровано, що високий рівень мРНК *CXCL13* у тканині РГЗ асоціюється із кращими показниками 5-річної безрецидивної виживаності хворих на РГЗ із люмінальним Б та базальними молекулярними підтипами. Зокрема, показники 5-річної безрецидивної виживаності у пацієток із високою експресією *CXCL13* у тканині РГЗ люмінального Б підтипу були на 16% ( $p < 0,05$ ) більшими порівняно із аналогічними значеннями хворих із низьким рівнем мРНК

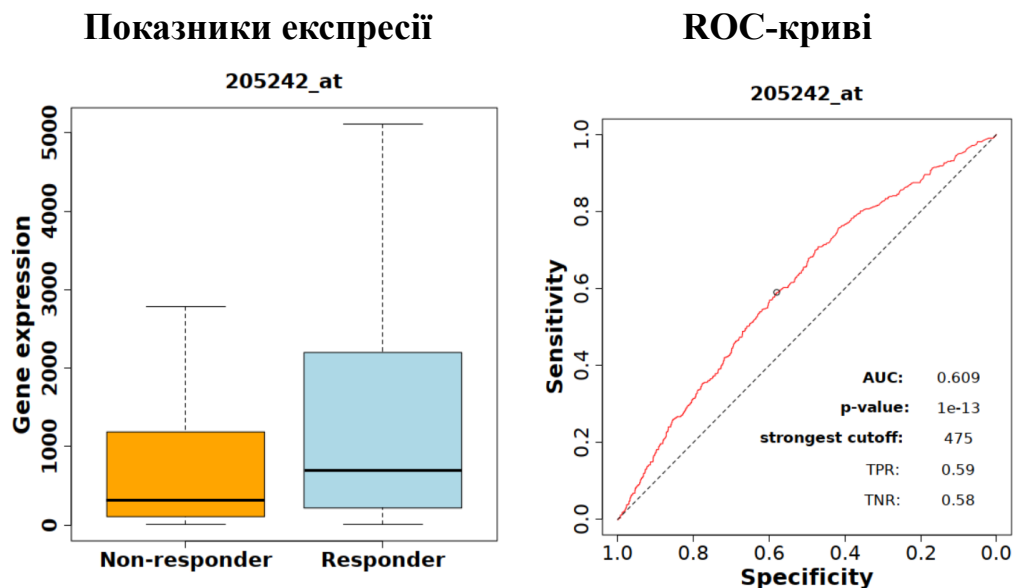
цього хемокіну. Виявлено, що 5-річна безрецидивна виживаність хворих на РГЗ базального молекулярного підтипу із високим рівнем експресії мРНК *CXCL13* була на 24% ( $p < 0,05$ ) більшою у порівнянні із пацієнтами із низьким рівнем мРНК цього хемокіну у пухлинній тканині. Не виявлено зв'язку між експресією *CXCL13* у тканині новоутворень та показниками безрецидивної виживаності хворих на РГЗ Люмінського А та HER2/неу-позитивних молекулярних підтипів (рис. 4.9).



**Рис. 4.9.** Показники безрецидивної виживаності залежно від експресії *CXCL13* на рівні мРНК в тканині РГЗ різних молекулярних підтипів: А – Люмінальний А, Б – Люмінальний Б, В – HER2/неу-позитивний, Г – Базальний.

#### 4.1.3. Аналіз показників експресії *CXCL13* для прогнозування ефективності антрацилін-вмісної неoad'ювантної поліхіміотерапії у хворих на РГЗ із використанням бази даних ROC-Plotter.

При аналізі зв'язку експресії *CXCL13* у тканині РГЗ залежно від клінічної ефективності антрациклін-вмісної НПХТ, виявлено достовірно вищі показники експресії цього хемокіну у пухлинній тканині хворих чутливих до терапії (Рис. 4.10). Як видно з даних, наведених на Рис. 4.10. рівень експресії гену *CXCL13* був у 1.4 рази ( $p < 0,05$ ) вищим у тканині РГЗ пацієток з позитивною відповіддю на НПХТ антрациклін-вмісними препаратами та складав  $Me = 696$  у.о. із коливаннями від 3 до 23408 у.о. порівняно із хворими, з негативною відповіддю на терапію, ( $Me = 318$  у.о. із відхиленнями від 2 до 28266 у.о.). Значення площі під графіком на ROC-кривій складало  $0,609$  ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 4.10.** Показники експресії *CXCL13* у тканині РГЗ хворих, що отримували лікування антрациклін-вмісними препаратами у неoad'ювантному режимі.

Встановлено (рис. 4.11), що експресія *CXCL13* в зразках пухлинної тканини хворих на РГЗ люмінального А молекулярного підтипу, у яких було визначено низьку ефективність терапії, становила  $Me = 212,0$  у.о. із відхиленнями від 5,0 до 28227,0 у.о.



В той же час, рівень експресії цього гену у пухлинній тканині хворих із чутливими до НПХТ антрациклін-вмісними препаратами пухлинами була достовірно вищою (у 1,6 рази) і становила  $Me = 539,0$  у.о із індивідуальними коливаннями від 3 до 23408 у.о. Значення площі під графіком на ROC-кривій дорівнювало 0,607 ( $p < 0,05$ ).

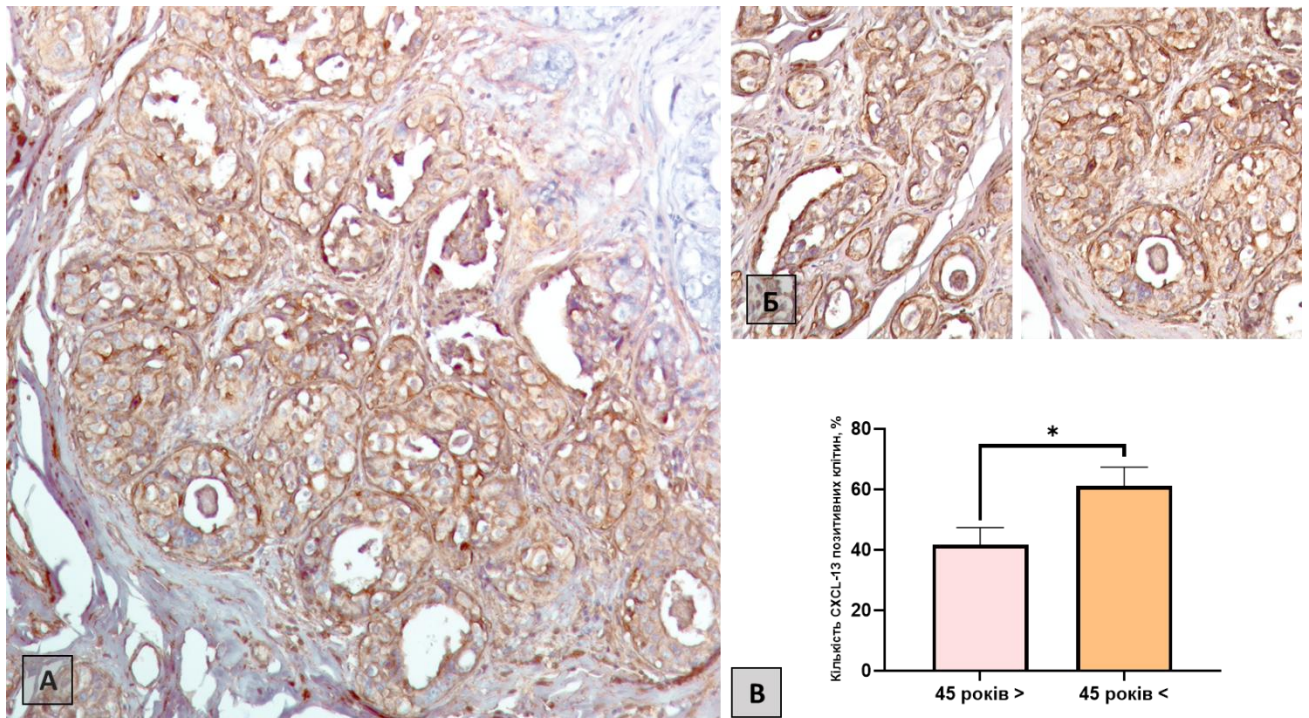
Подібну тенденцію встановлено і у хворих на РГЗ люмінального Б молекулярного підтипу. Зокрема рівень експресії *CXCL13* в зразках РГЗ Люмінального Б підтипу хворих, у яких було визначено низьку ефективність терапії антрациклінами, становив  $Me = 234,0$  у.о. із індивідуальними коливаннями від 2,0 до 28266,0 у.о. та був у 1,2 рази ( $p < 0,05$ ) нижчим порівняно із аналогічними показниками у групі хворих із чутливими до НПХТ новоутвореннями ( $Me = 440,0$  у.о із індивідуальними коливаннями від 16 до 15201 у.о. Значення площі під графіком на ROC-кривій дорівнювало 0,603 ( $p < 0,05$ ). У хворих на РГЗ базального підтипу із чутливими до НПХТ антрациклін-вмісними препаратами новоутвореннями рівень мРНК *CXCL13* становив  $Me = 2098,0$  у.о. з індивідуальними коливаннями від 6 до 21326 у.о. та був у 1,4 рази ( $p < 0,05$ ) вищим у порівнянні із показниками пацієток у яких було визначено низьку ефективність терапії становила  $Me = 574,0$  у.о. (коливання рівня від 7,0 до 19721,0 у.о.). Значення площі під графіком на ROC-кривій дорівнювало 0,605 ( $p < 0,05$ ). Зазначимо, що достовірної різниці показників експресії мРНК *CXCL13* у тканині хворих на РГЗ HER2/неу-позитивного молекулярного підтипу залежно від чутливості до НПХТ антрациклінами не визначено.

Отже, отримані дані вказують на перспективність використання показників експресії *CXCL13* на рівні мРНК з метою прогнозування чутливості до НПХТ.

#### **4.2. Зв'язок показників експресії *CXCL13* на рівні білка у пухлинній тканині із клінічним статусом хворих на РГЗ із врахуванням вікових особливостей пацієнток**

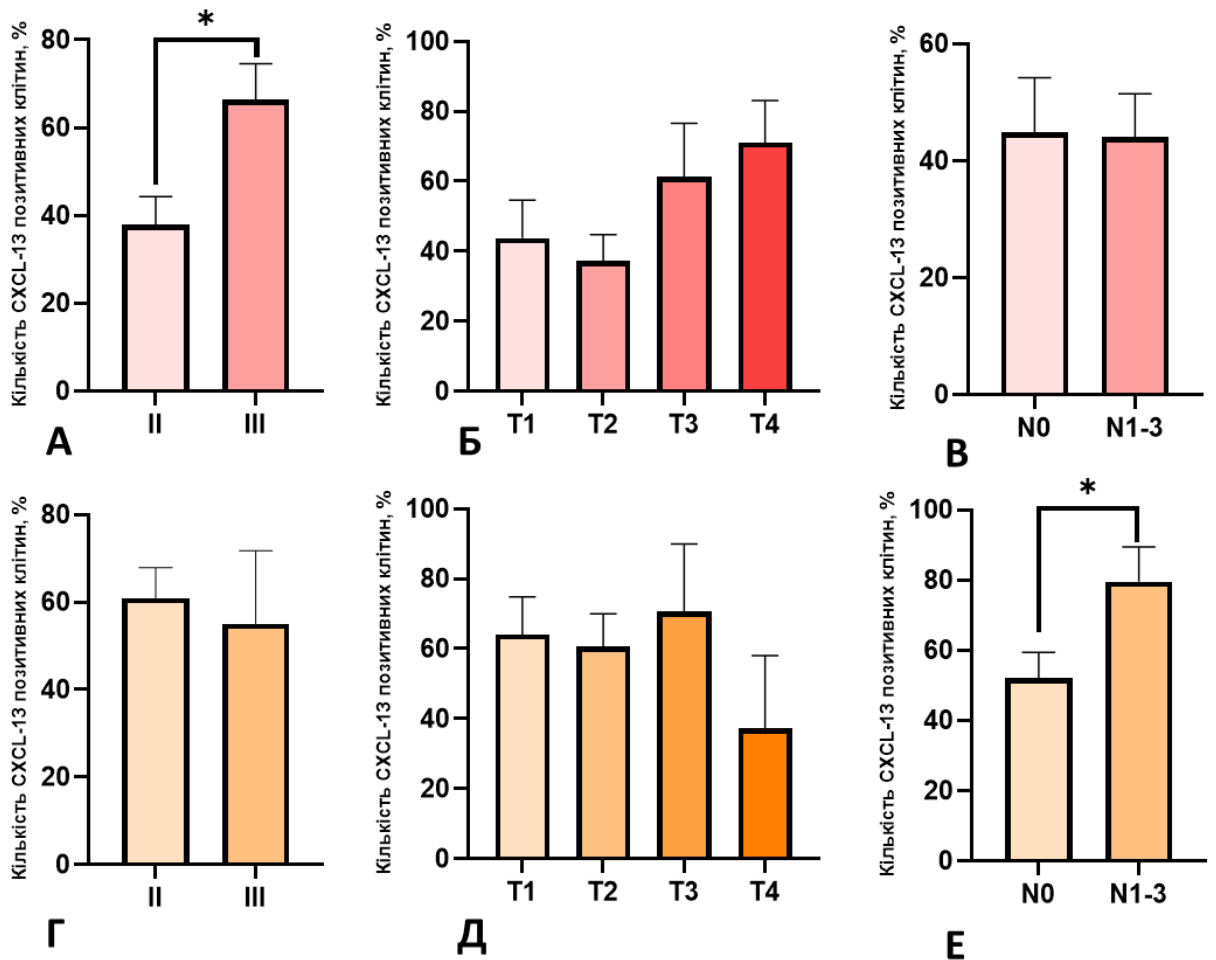
Імуногістохімічне дослідження продемонструвало слабо- та середньопозитивну експресію *CXCL13* у клітинах РГЗ з чіткою топографічною організацією та внутрішньопухлинною гетерогенністю. Як видно з даних на рис.4.12. А та Б, *CXCL13* локалізувався переважно в цитоплазмі пухлинних клітин. Забарвлення мало дифузний або дрібнозернистий характер, у частини клітин із помірним перинуклеарним підсиленням сигналу, що може свідчити про активний синтез і секрецію хемокіну. Ядерна експресія *CXCL13* не визначалася. У стромальному компоненті РГЗ експресія *CXCL13* переважно не визначалася або мала слабо позитивний характер. Чітке обмеження експресії дослідженого хемокіну злоякісно трансформованими клітинами створювало контраст між епітеліальними та стромальними компонентами РГЗ, що добре візуалізувалося на препаратах при середньому та високому збільшенні.

Після оцінки результатів імуногістохімічного аналізу експресії *CXCL13* у тканині РГЗ встановлено асоціацію показників цієї імунорегуляторної молекули із віком хворих (рис.4.12. В). Показано, що у пацієнток з РГЗ молодого віку кількість позитивних на *CXCL13* клітин була на 20,1% ( $p < 0.05$ ) нижчою порівняно із пацієнтками, старшими за 45 років.



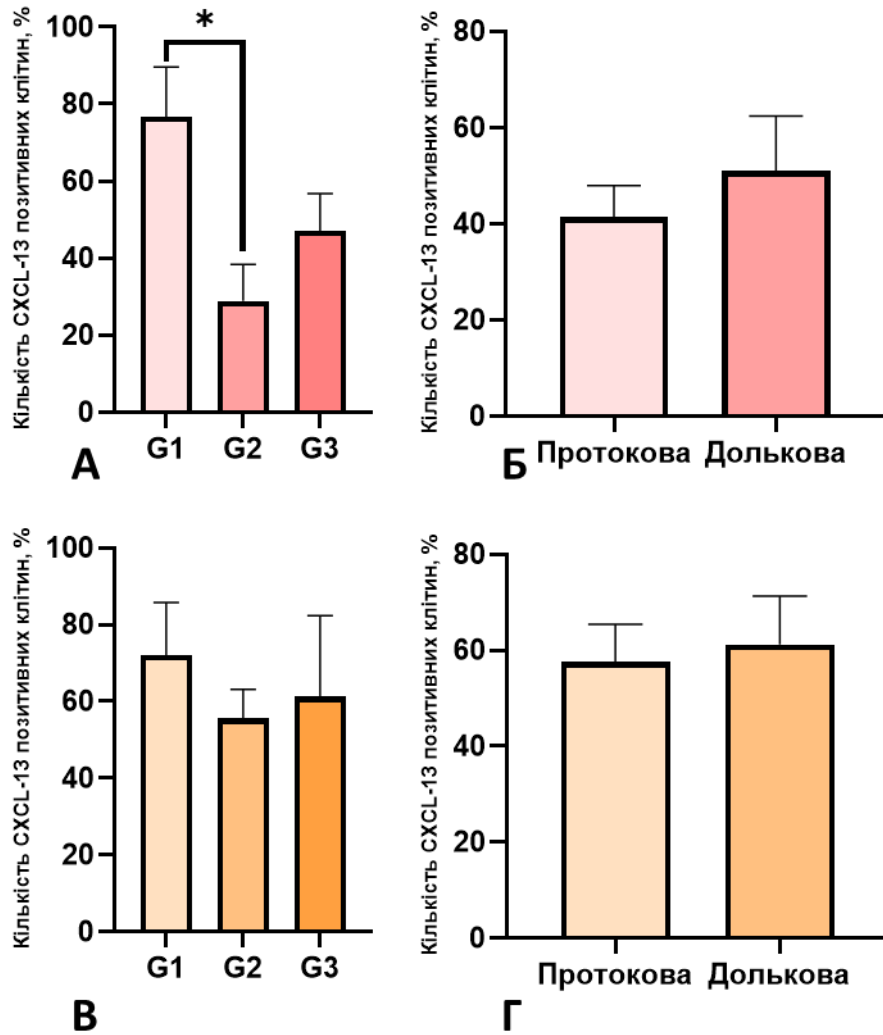
**Рис.4.12. Експресія CXCL13 у тканині раку грудної залози**  
 Імуногістохімічна візуалізація експресії CXCL13 у пухлинній тканині РГЗ (А, Б) з переважною цитоплазматичною локалізацією в пухлинних клітинах. Кількісна оцінка рівнів експресії CXCL13 у тканині РГЗ залежно від віку пацієнток (В)

Виявлено зв'язок показників експресії CXCL13 із клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу з урахуванням віку пацієнток. Так, показано, що у тканині РГЗ хворих, молодших за 45 років, кількість CXCL13-позитивних пухлинних клітин зростала на 28,58% ( $p=0.05$ ) у когорті пацієнток із III стадією пухлинного процесу порівняно із групою хворих на РГЗ II стадії. Водночас різниці у показниках експресії цієї молекули залежно від категорії Т не було виявлено у обох вікових групах. Варто зазначити, що характерною особливістю РГЗ хворих старшого віку із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів було збільшення на 27,5% ( $p<0.05$ ) кількості CXCL13-позитивних клітин (рис.4.13.).



**Рис.4.13.** Зв'язок показників експресії CXCL13 у тканині РГЗ зі стадією пухлинного процесу (А, Г), розміром новоутворень (Б, Д) та статусом регіонарних лімфатичних вузлів (В, Е) хворих молодших (А-В) та старших (Г-Д) за 45 років.

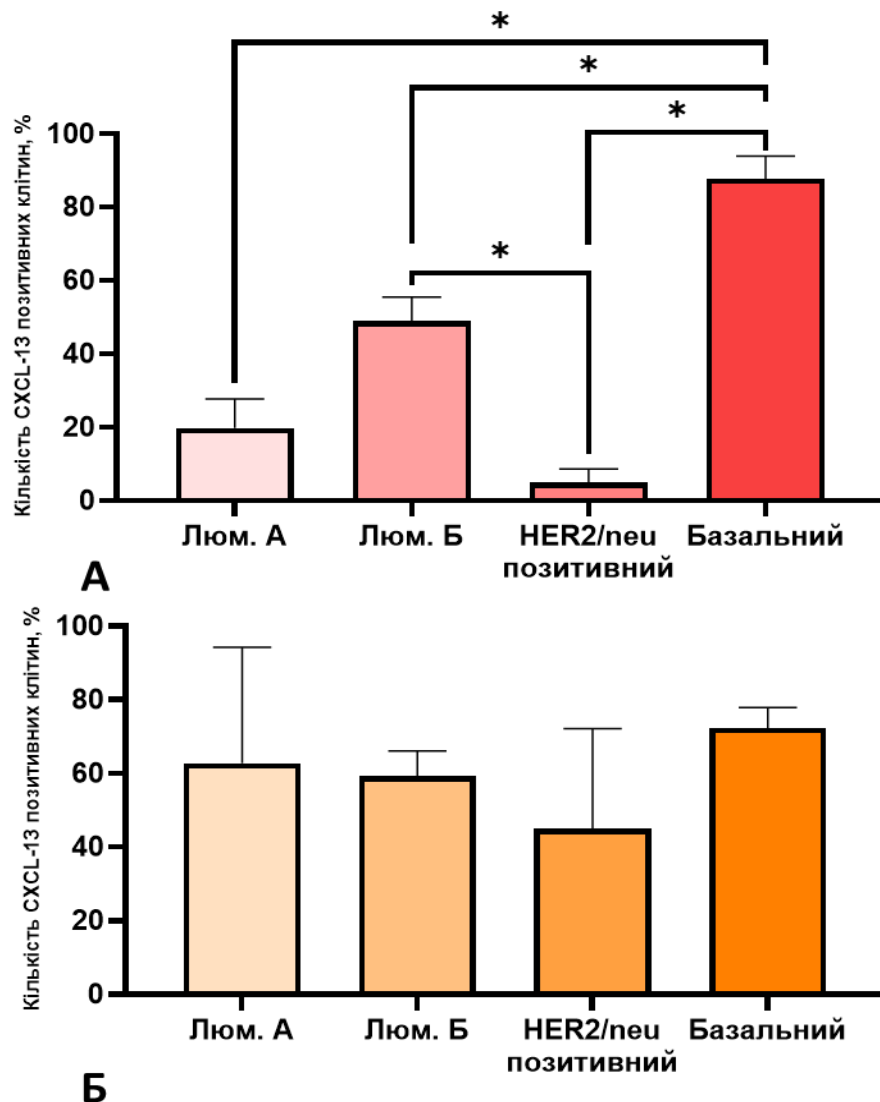
Підвищення кількості CXCL13-позитивних клітин на 47,74% ( $p < 0.05$ ) зафіксовано у тканині високодиференційованих новоутворень грудної залози хворих віком до 45 років порівняно із пухлинами помірного ступеня диференціювання (рис.4.14.). Залежностей рівнів експресії CXCL13 від гістологічного типу РГЗ хворих різних вікових груп не встановлено.



**Рис.4.14.** Зв'язок показників експресії CXCL13 від ступеня диференціювання (А, В) та гістологічного типу (Б, Г) РГЗ хворих молодших (А-Б) та старших (В-Г) за 45 років.

Встановлено, що тканина РГЗ тричі-негативного молекулярного підтипу молодих пацієнток, характеризується збільшенням кількості CXCL13-позитивних клітин на 68,04%( $p < 0.05$ ), 38,9%( $p < 0.05$ ) та 82,89%( $p < 0.05$ ) порівняно із тканиною РГЗ люмінального А, люмінального Б та HER2/neu позитивного підтипів відповідно (рис.4.15.). Водночас у тканині люмінального Б молекулярного підтипу РГЗ хворих, молодших за 45 років, зафіксовано підвищення кількості CXCL13-позитивних клітин на 29,14 % ( $p < 0.05$ ) та 43,99%

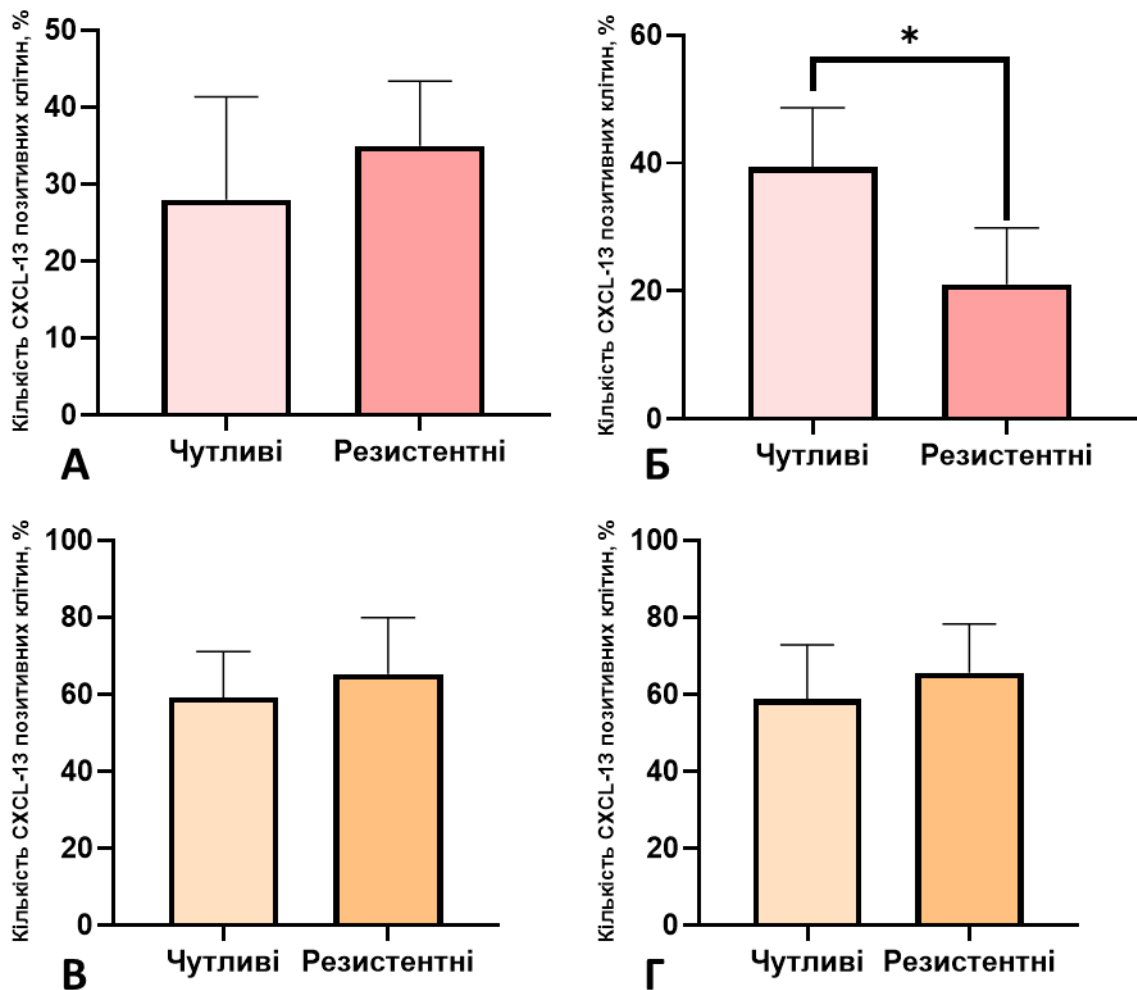
( $p < 0.05$ ) порівняно із РГЗ люмінального А та HER2/neu-позитивного підтипів хворих цієї ж вікової групи.



**Рис.4.15.** Зв'язок показників експресії CXCL13 від молекулярного підтипу РГЗ хворих, молодших (А) та старших (Б) за 45 років.

Наступним етапом дослідження стала оцінка предиктивного значення експресії CXCL13 у хворих на РГЗ різних вікових груп, що отримували лікування за схемою 4АС у неoad'ювантному режимі (рис.4.16). Залежності кількості CXCL13-позитивних клітин від клінічної ефективності лікування за системою RECIST 1.1. не виявлено. З'ясовано, що високий ступінь лікувального

патоморфозу за Miller-Payne у тканині РГЗ хворих молодого віку асоціюється із збільшенням на 18,34% ( $p < 0.05$ ) кількості CXCL13-позитивних клітин.



**Рис.4.16.** Зв'язок показників експресії CXCL13 від клінічного ефекту НПХТ за системою RECIST1.1 (А, В) та ступеня лікувального патоморфозу за Miller-Payne (Б, Г) у хворих молодших (А-Б) та старших (В-Г) за 45 років

Таким чином показано, що зростання кількості CXCL13-позитивних малігнізованих клітин у пухлинному осередку хворих молодого віку асоціюється із III стадією пухлинного процесу, високим ступенем диференціювання, люмінальним Б та базальним молекулярними підтипами, а також високим ступенем патоморфозу після НПХТ за схемою 4АС.

Аналіз даних топології експресії CXCL13 у тканині РГЗ дозволив встановити, що цей білок експресується переважно трансформованими епітеліальними клітинами з чіткою цитоплазматичною локалізацією та вираженою внутрішньопухлинною гетерогенністю. Виявлений характер експресії узгоджується з даними досліджень, у яких CXCL13 розглядається як молекула, що може синтезуватися безпосередньо пухлинними клітинами, а не лише клітинами імунного мікрооточення РГЗ [113].

Виявлені вікові відмінності експресії CXCL13, зокрема зниження його показників у тканині РГЗ хворих молодшого віку порівняно зі старшою віковою групою, можуть відображати особливості біології пухлин у різних вікових когортах [114]. Водночас підвищення експресії CXCL13 у молодих пацієнток із III стадією захворювання свідчить про можливу участь цього хемокіну у процесах прогресії РГЗ.

Заслуговує на увагу детектована нами асоціація CXCL13 із молекулярними підтипами РГЗ. Найвища експресія CXCL13 була характерна для базального та люмінального Б підтипів РГЗ, які відрізняються підвищеною проліферативною активністю та більш агресивним перебігом пухлинного процесу [115]. Водночас люмінальний Б підтип демонстрував проміжні, але достовірно більші показники CXCL13 порівняно з люмінальним А молекулярним підтипом, що може відображати проміжні біологічні властивості цього підтипу між гормонозалежними та більш агресивними формами РГЗ.

CXCL13 у цьому контексті може виконувати роль медіатора локальної імунної організації, сприяючи рекрутуванню В-лімфоцитів та формуванню імунних ніш у пухлинному осередку [116]. Такий механізм узгоджується з даними літератури, де CXCL13 розглядається як маркер активованого імунного мікрооточення та третинних лімфоїдних структур, що частіше детектуються у біологічно агресивних, але водночас імунореактивних новоутвореннях грудної залози [113]. Низька експресія CXCL13 у люмінальному А підтипі РГЗ вірогідно

обумовлена низьким проліферативним потенціалом та стабільним гормонозалежним фенотипом цих пухлин.

Цікаво, що експресія CXCL13 у тканині РГЗ молодих пацієток прямо залежала від ступеня лікувального патоморфозу після неoad'ювантної поліхіміотерапії за схемою 4АС. Це узгоджується з літературними даними, які вказують на потенційну роль CXCL13 як маркера чутливості пухлин до цитостатичної терапії, особливо у біологічно активних, високопроліферативних підтипах РГЗ [115].

Таким чином, результати дослідження свідчать, що CXCL13 може розглядатися як важливий компонент біологічної гетерогенності РГЗ, асоційований із віком пацієток, клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу, молекулярним підтипом РГЗ та ефективністю лікування. Подальші дослідження необхідні для уточнення молекулярних механізмів дії CXCL13 та оцінки його потенційної прогностичної і предиктивної значущості.

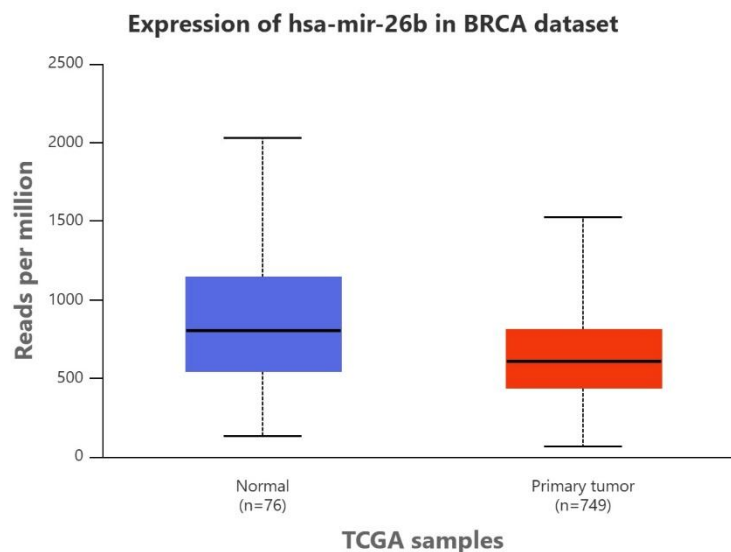
Результати проведених досліджень в розділі 4, опубліковано у [128, 129].

## РОЗДІЛ 5. ПРОГНОСТИЧНЕ ТА ПРЕДИКТИВНЕ ЗНАЧЕННЯ ПУХЛИНО-АСОЦІЙОВАНИХ мікроРНК-26b-5p ТА мікроРНК-186- 5p У ТКАНИНІ РГЗ ХВОРИХ МОЛОДОГО ВІКУ

В подальшому нами проведено аналіз потенційних мікроРНК-регуляторів експресії CXCL13, які мають потенціал як прогностичні та предиктивні маркери при РГЗ. Нами виявлено 43 мікроРНК, що регулюють експресію CXCL13, серед яких після аналізу літературних даних для подальшого дослідження було відібрано 2 кандидати: мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p.

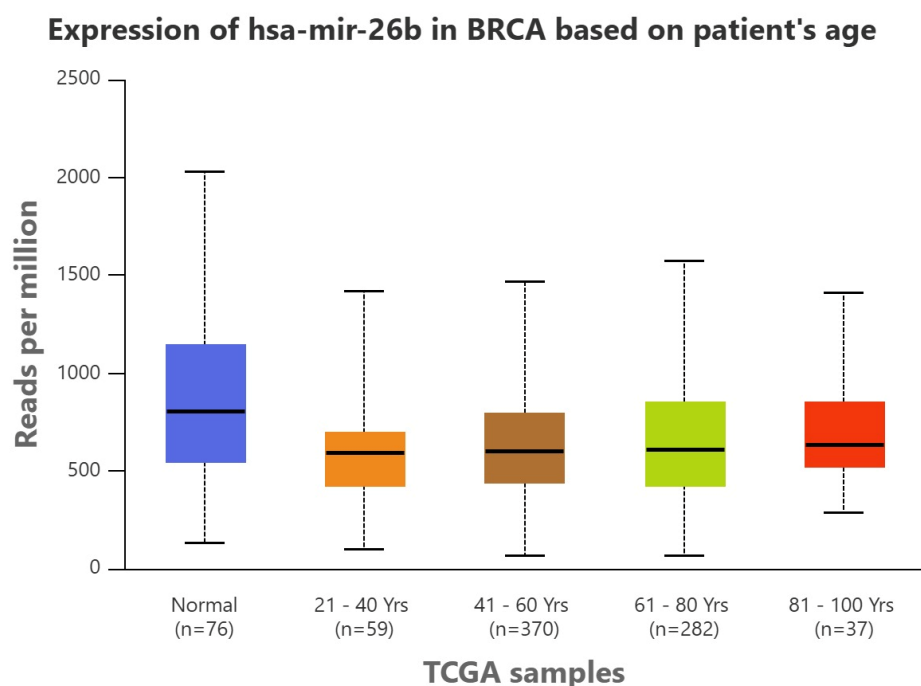
**5.1. Біоінформатичний аналіз зв'язку показників експресії пухлинно-асоційованих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p з клініко-патологічними характеристиками РГЗ із використанням бази даних UALCAN.**

Як видно з даних, наведених на рис.5.1., у тканині РГЗ рівень hsa-mir-26b становив 604,53 RPM при індивідуальних коливаннях від 65,134 до 1527, 823 RPM, що було в 1,3 рази ( $p < 0,05$ ) більше у порівнянні з умовно нормальною тканиною грудної залози, де середній рівень зазначеної мікроРНК складав 806,05 RPM з індивідуальними коливаннями від 135,441 до 2029,108 RPM.



**Рис.5.1.** Показники експресії hsa-mir-26b в умовно нормальній та злоякісно трансформованій тканині грудної залози

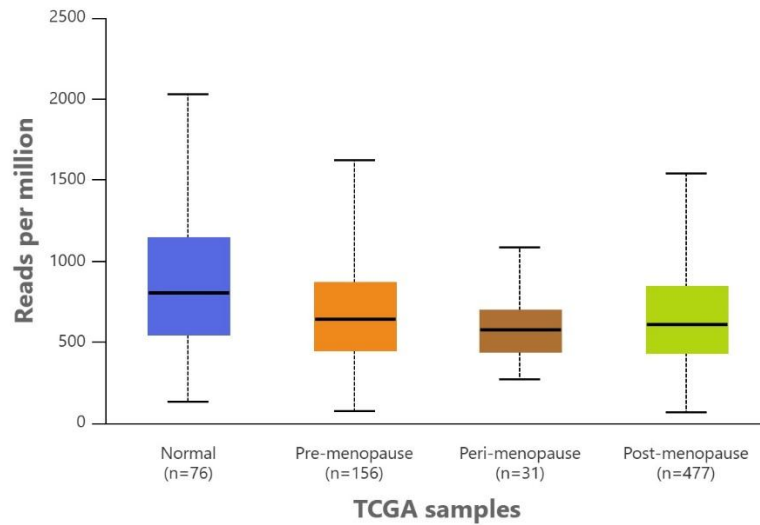
При аналізі зв'язку експресії мікроРНК із клініко-патологічними характеристиками РГЗ не виявлено достовірної різниці рівнів hsa-miR-26b у пухлинній тканині залежно від віку хворих на РГЗ (рис.5.2.). Зокрема, у вікових групах 21–40, 41–60, 61–80 та 81–100 років середні показники її експресії дорівнювали відповідно 589,426 RPM; 598,713 RPM; 612,158 RPM та 636,25 RPM, а індивідуальні значення варіювали в межах 103,694–1420,275 RPM; 65,134–1465,252 RPM; 65,159–1576,233 RPM та 287,517–1407,778 RPM відповідно.



**Рис.5.2.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-26b у тканині РГЗ з віком хворих

Біоінформатичний аналіз не виявив статистично значущих відмінностей у показниках експресії пухлиноасоційованої hsa-miR-26b залежно від гормонального статусу хворих. Як видно з даних, наведених на рис. 5.3. у тканині РГЗ пацієнок у пре-, пері- та постменопаузі медіанні значення hsa-miR-26b становили 806,05 RPM; 638,999 RPM; 578,039 RPM та 604,897 RPM відповідно, а діапазон індивідуальних значень коливався від 135,441 до 2029,108 RPM, від 74,103 до 1624,362 RPM, від 267,763 до 1085,294 RPM та від 65,134 до 1541,184 RPM відповідно.

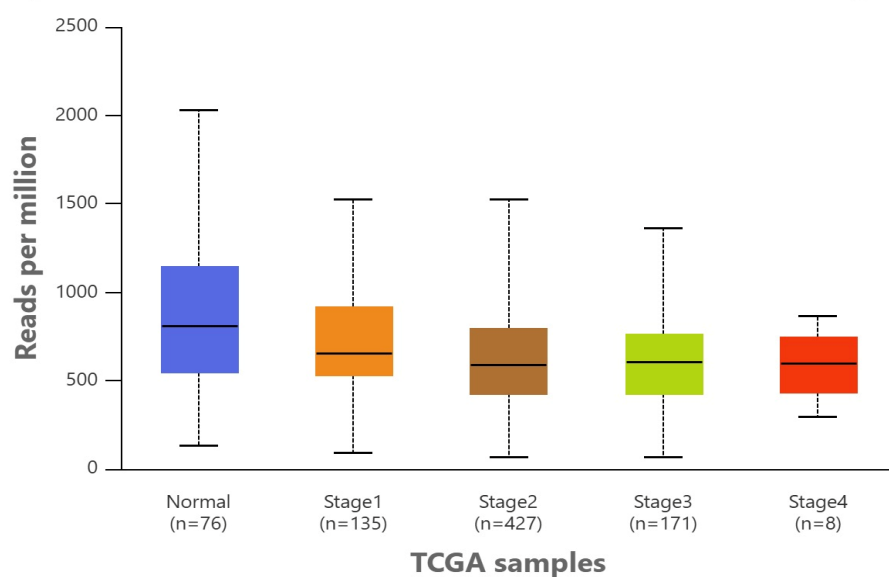
**Expression of hsa-mir-26b in BRCA based on Menopause status**



**Рис.5.3.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-26b у тканині РГЗ із репродуктивним статусом хворих.

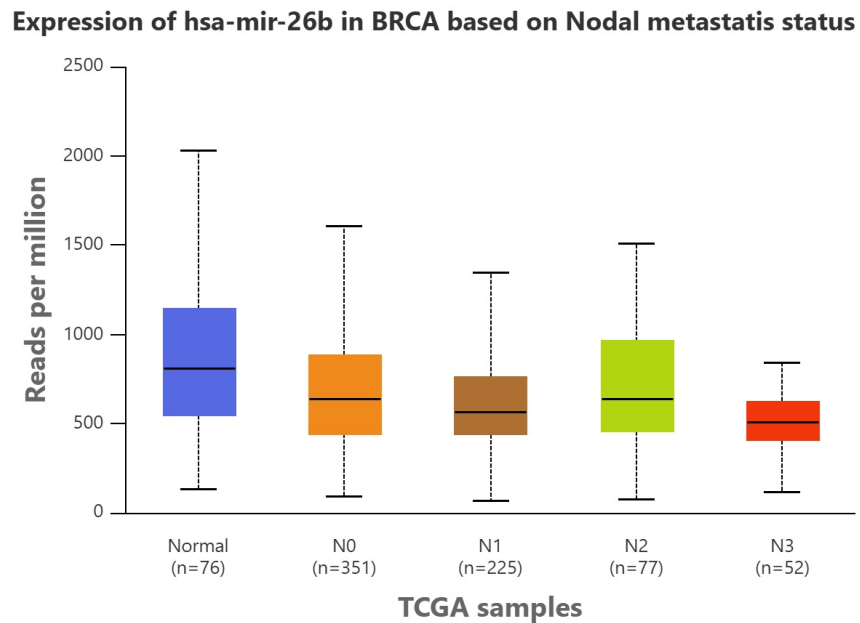
Встановлено, що рівень hsa-mir-26b був достовірно вищим (Рис.5.4) у пацієток з I стадією захворювання (653,649 RPM при індивідуальних коливаннях від 93,116 RPM до 1525,61 RPM), порівняно з хворими на РГЗ IV стадії (598,051 RPM при індивідуальних коливаннях від 296,878 RPM до 862,427 RPM).

**Expression of hsa-mir-26b in BRCA based on individual cancer stages**



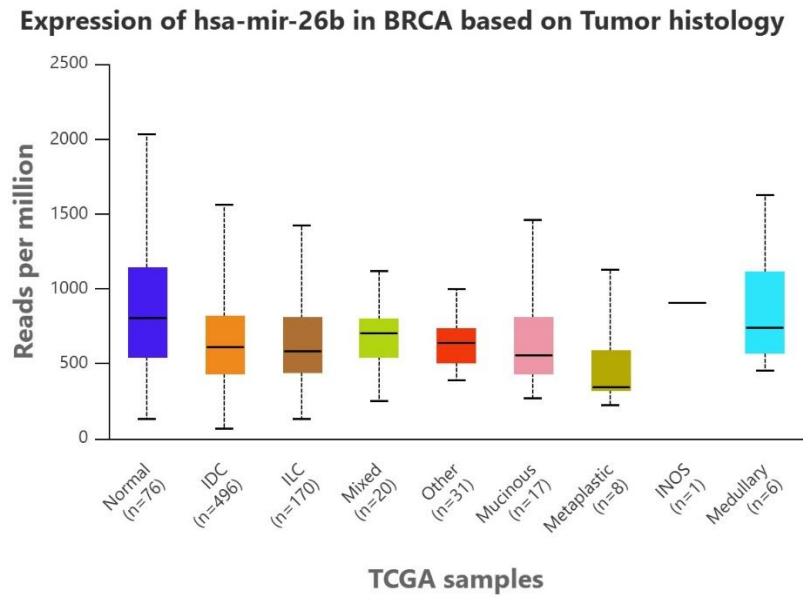
**Рис.5.4.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-26b у тканині РГЗ із стадією пухлинного процесу

Не встановлено достовірної різниці показників експресії hsa-miR-26b у пухлинній тканині залежно від наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (рис. 5.5.). Так, у тканині РГЗ хворих категорії N0, N1, N2 та N3 медіана експресія цієї мікроРНК становила відповідно 636,548 RPM; 563,173 RPM; 636,038 RPM та 503,087 RPM, а індивідуальні коливання знаходилися в межах 90,721–1610,025 RPM (N0), 65,134–1343,083 RPM (N1), 74,103–1509,703 RPM (N2) та 113,195–843,992 RPM (N3).



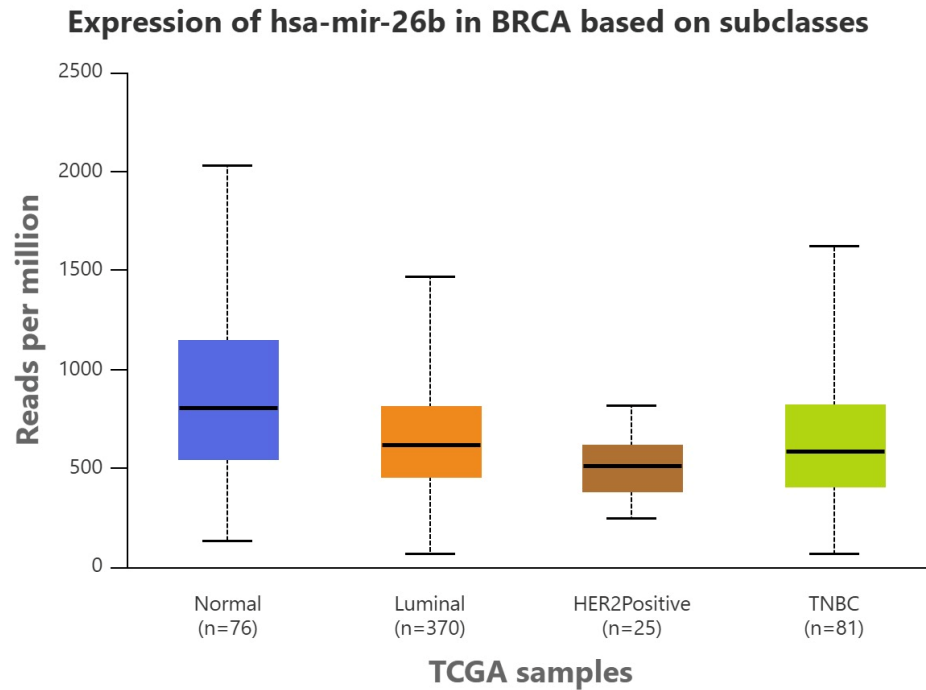
**Рис.5.5.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-26b у тканині РГЗ залежно від ступеня метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів

Аналіз експресії hsa-miR-26b у пухлинній тканині різних гістологічних підтипів не продемонстрував достовірних відмінностей між її показниками у зразках інвазивної протокової (IDC) та інвазивної долькової карциноми (ILC) (рис. 5.6.). Зокрема, у тканині IDC медіана експресії hsa-miR-26b становила 611,312 RPM при індивідуальних коливаннях від 65,134 до 1 558,088 RPM, а у тканині ILC аналогічний показник дорівнював 581,729 RPM з діапазоном коливань 136,009–1 427,542 RPM.



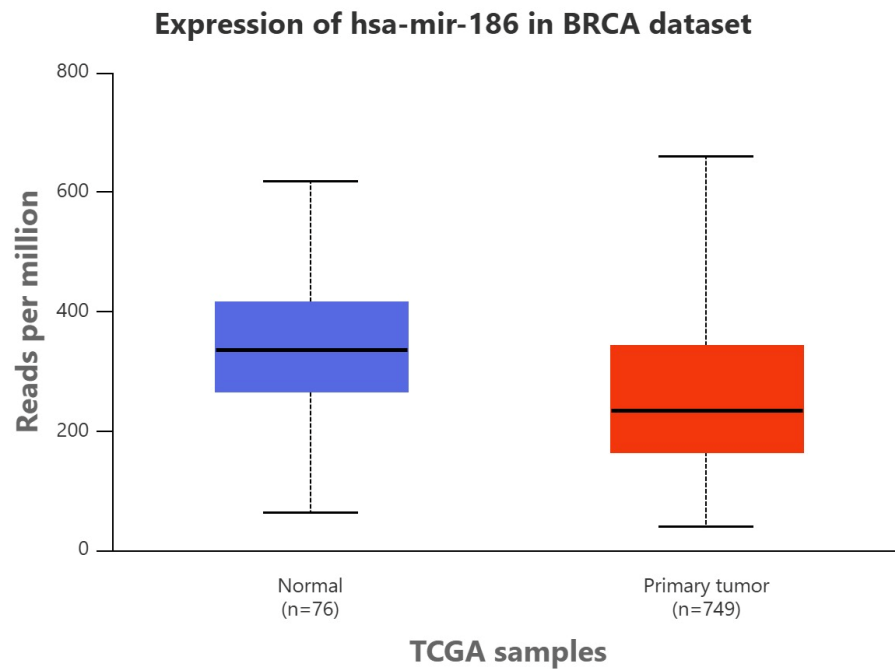
**Рис.5.6.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-26b у пухлинній тканині із гістологічним типом РГЗ

Показано, що експресія hsa-miR-26b у тканині люмінальних підтипів РГЗ (медіана 614,136 RPM; діапазон 65,159–1465,252 RPM) була у 1,21 рази більшою порівняно з аналогічними показниками у тканині РГЗ HER2-позитивного підтипу (медіана 506,976 RPM; діапазон 243,182–816,874 RPM). Крім того, рівень hsa-miR-26b у тканині РГЗ базального підтипу (медіана 586,759 RPM; діапазон 65,134–1626,095 RPM) був у 1,16 разу вищим, ніж у тканині HER2-позитивного підтипу (506,976 RPM; 243,182–816,874 RPM) (рис.5.7.).



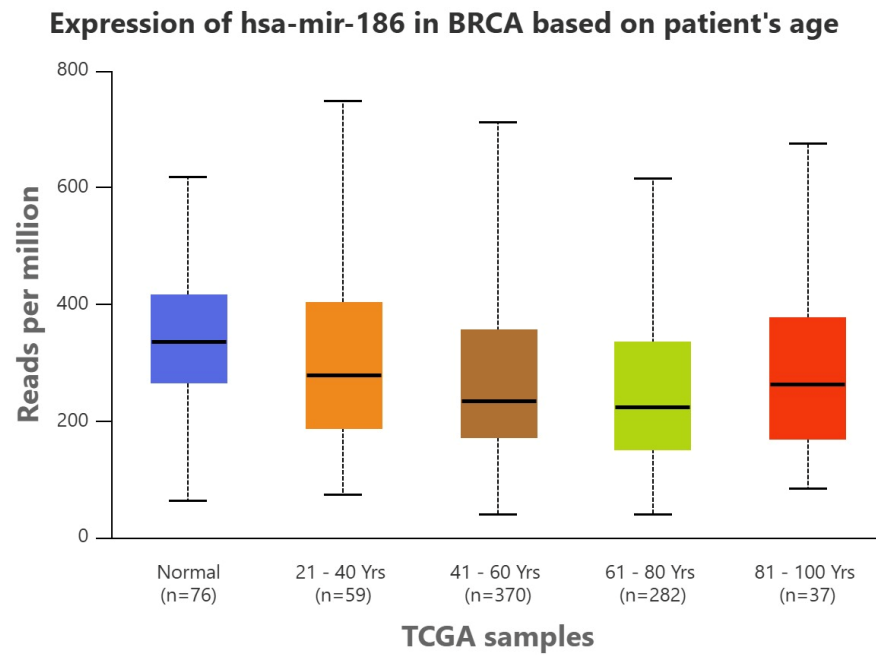
**Рис.5.7.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-26b у пухлинній тканині із молекулярним підтипом РГЗ

При аналізі, діагностичного значення експресії hsa-miR-186 з'ясовано, що розвиток злоякісних новоутворень у грудній залозі супроводжується зменшенням її рівня у пухлинній тканині (рис.5.8.). Зокрема, середній рівень hsa-miR-186 у тканині РГЗ був у 1,45 рази меншим і становив 233,013 RPM при коливаннях індивідуальних значень від 39,995 до 659,719 RPM, тоді як у зразках умовно нормальної тканини грудної залози рівні експресії цієї мікроРНК досягали 336,714 RPM (діапазон 62,037–619,194 RPM).



**Рис.5.8.** Показники експресії hsa-miR-186 в умовно нормальній та злоякісно трансформованій тканині грудної залози

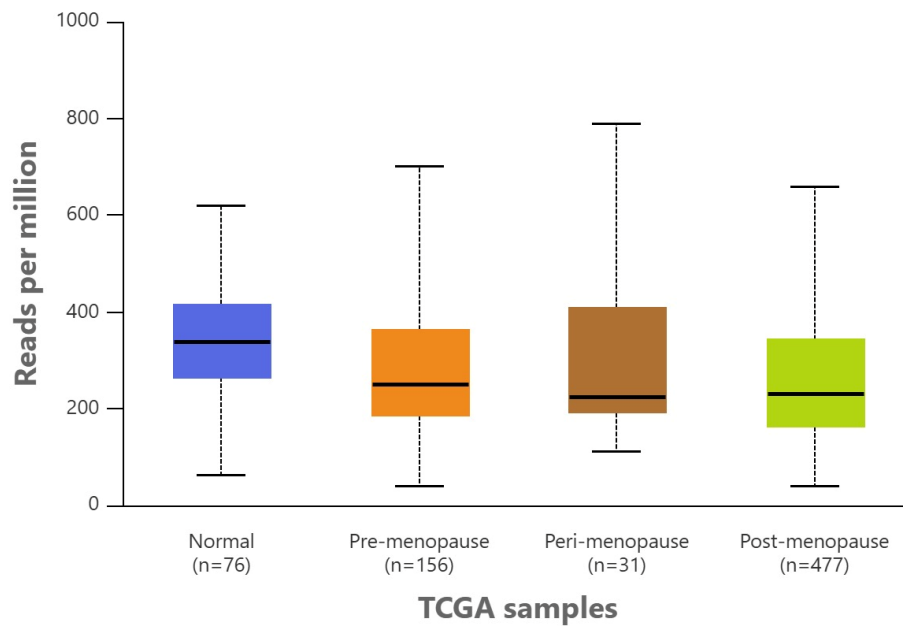
Аналіз вікових особливостей експресії hsa-miR-186 дозволив виділити групи, між якими спостерігалися статистично значущі відмінності її рівня. Як видно з даних, наведених на рис.5.9. у тканині РГЗ хворих віком 21–40 років середній рівень hsa-miR-186 становив 277,688 RPM при індивідуальних коливаннях від 74,868 до 747,624 RPM, тоді як у групі пацієток 41–60 років — 234,508 RPM із діапазоном 39,995–711,806 RPM, що відповідає зниженню у 1,18 разів. Подальше порівняння показало, що у тканині РГЗ хворих 61–80 років рівень мікроРНК зменшувався до 224,426 RPM (межі 40,336–614,406 RPM), що є нижчим за показник пацієток 41–60 років у 1,04 раза. У пухлинній тканині жінок віком 81–100 років медіана експресії hsa-miR-186 становила 263,035 RPM при індивідуальних коливаннях 84,473–674,998 RPM, що перевищує її рівень у пацієток 61–80 років у 1,17 рази.



**Рис.5.9.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-186 у тканині РГЗ з віком хворих

Біоінформатичний аналіз не виявив статистично значущих відмінностей у показниках експресії пухлино-асоційованої hsa-miR-186 між пацієнтками з різним репродуктивним статусом (рис. 5.10.). Так, у групах хворих, що знаходились у стані пре-, пері- та постменопаузи середні значення експресії hsa-miR-186 у тканині РГЗ становили 224,426 RPM; 231,851 RPM та 250,445 RPM відповідно, а діапазон індивідуальних значень коливався від 113,047 до 789,128 RPM, від 40,336 до 6659,719 RPM та від 39,995 до 702,156 RPM відповідно.

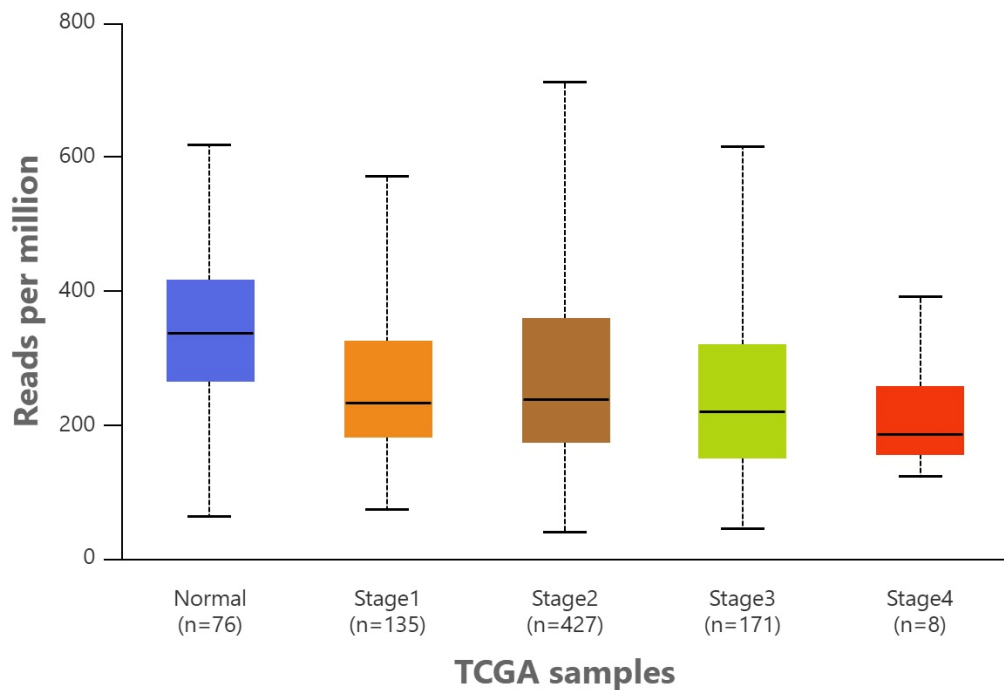
**Expression of hsa-mir-186 in BRCA based on Menopause status**



**Рис.5.10.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-186 у тканині РГЗ із репродуктивним статусом хворих

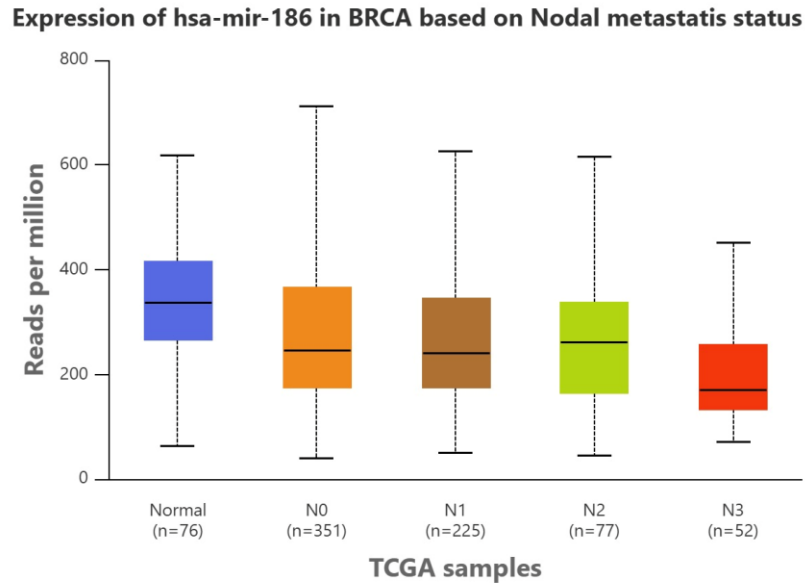
Рівень зазначеної мікроРНК тканині РГЗ пацієнок із I стадією становив 233,637 RPM при індивідуальних коливаннях від 72,548 до 570,273 RPM, тоді як у хворих на II стадію пухлинного процесу він був у 1,02 рази більшим і дорівнював 238,152 RPM із діапазоном значень 39,995–713,037 RPM. Порівняння II та III стадій показало достовірне зниження у 1,08 рази середнього рівня з 238,152 до 220,316 RPM із коливаннями 44,788–614,406 RPM (рис.5.11.).

**Expression of hsa-mir-186 in BRCA based on individual cancer stages**



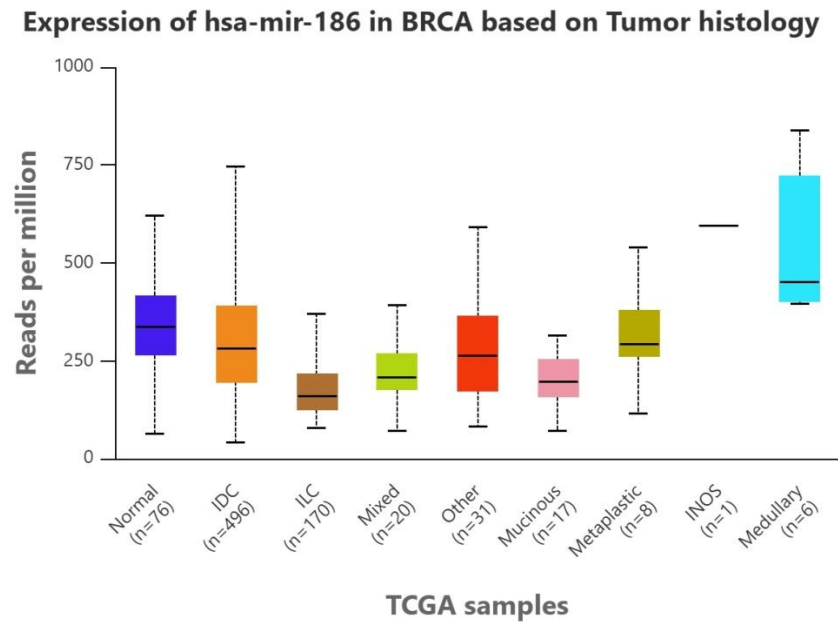
**Рис.5.11.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-186 у тканині РГЗ із стадією пухлинного процесу

При аналізі експресії hsa-miR-186 залежно від ступеня метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів встановлено (рис.5.12), що найнижчі її значення спостерігалися у тканині РГЗ хворих категорії N3 за класифікацією TNM (169,099 RPM з індивідуальними коливаннями 70,073–452,138 RPM), В протилежність цьому, у пухлинній тканині хворих без метастазів у регіонарні лімфатичні вузли (категорія N0) медіана експресії становила 246,400 RPM (39,995–713,037 RPM) та була у 1,46 рази більшою порівняно з пацієнтками категорії N3. У тканині РГЗ хворих категорії N1 експресія hsa-miR-186 дорівнювала 239,619 RPM (49,387–625,389 RPM), що перевищувало аналогічний показник у хворих категорії N3 у 1,42 раза. У групі хворих категорії N2 медіана експресії hsa-miR-186 становила 260,461 RPM (44,788–614,406 RPM) та була вищою у 1,54 рази у порівнянні з пухлинної тканиною пацієнток категорії N3.



**Рис.5.12.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-186 у тканині РГЗ із ступенем метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів

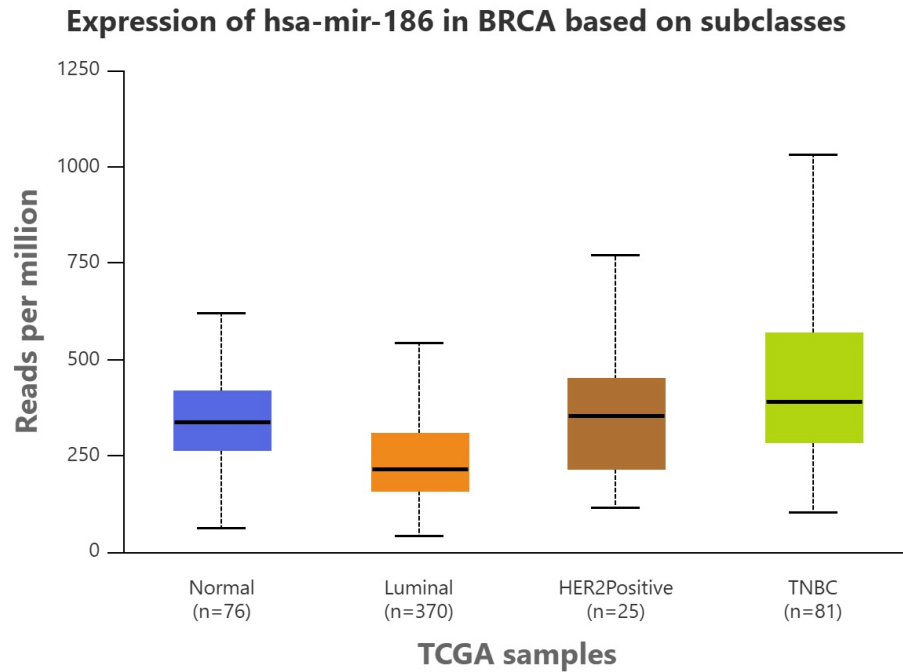
Аналіз експресії hsa-miR-186 у різних гістологічних підтипах РГЗ продемонстрував статистично значущі відмінності між IDC та ILC (рис. 5.13). У групі IDC середнє значення становило 279,542 RPM при індивідуальних коливаннях від 39,995 до 747,624 RPM. Натомість у пацієток з ILC рівень експресії був достовірно нижчим (медіана 159,128 RPM; діапазон 77,686–369,996 RPM). Відповідно, експресія hsa-miR-186 у IDC була приблизно у 1,76 разу вищою, ніж у ILC ( $p < 0,05$ ).



**Рис.5.13.** Зв'язок показників експресії hsa-miR-186 у пухлинній тканині із гістологічним типом РГЗ

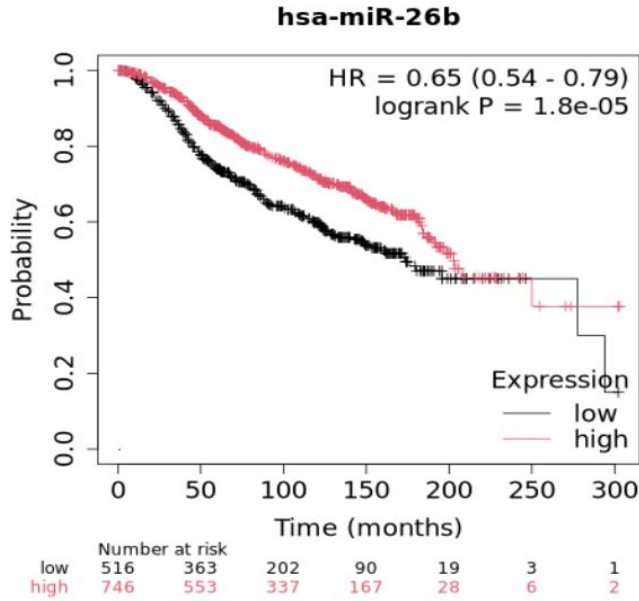
При аналізі рівнів експресії hsa-miR-186 залежно від молекулярного підтипу РГЗ (рис.5.14.), найнижчі її показники зафіксовано у тканині РГЗ люмінальних підтипів (медіана 212,753 RPM; 41,161–544,410 RPM). У тканині HER2-позитивних пухлин експресія була достовірно вищою у 1,66 разу порівняно з люмінальними підтипами новоутворень (медіана 353,705 RPM; 117,014–770,840 RPM;  $p < 0,05$ ).

Найбільші показники експресії hsa-miR-186 відзначено у тканині базального молекулярного підтипу РГЗ (медіана 389,957 RPM; 104,536–1 030,951 RPM), де рівень hsa-miR-186 перевищував аналогічні показники у зразках РГЗ люмінальних підтипів у 1,83 разу ( $p < 0,01$ ) та HER2-позитивного підтипу — у 1,10 разу ( $p < 0,05$ ).

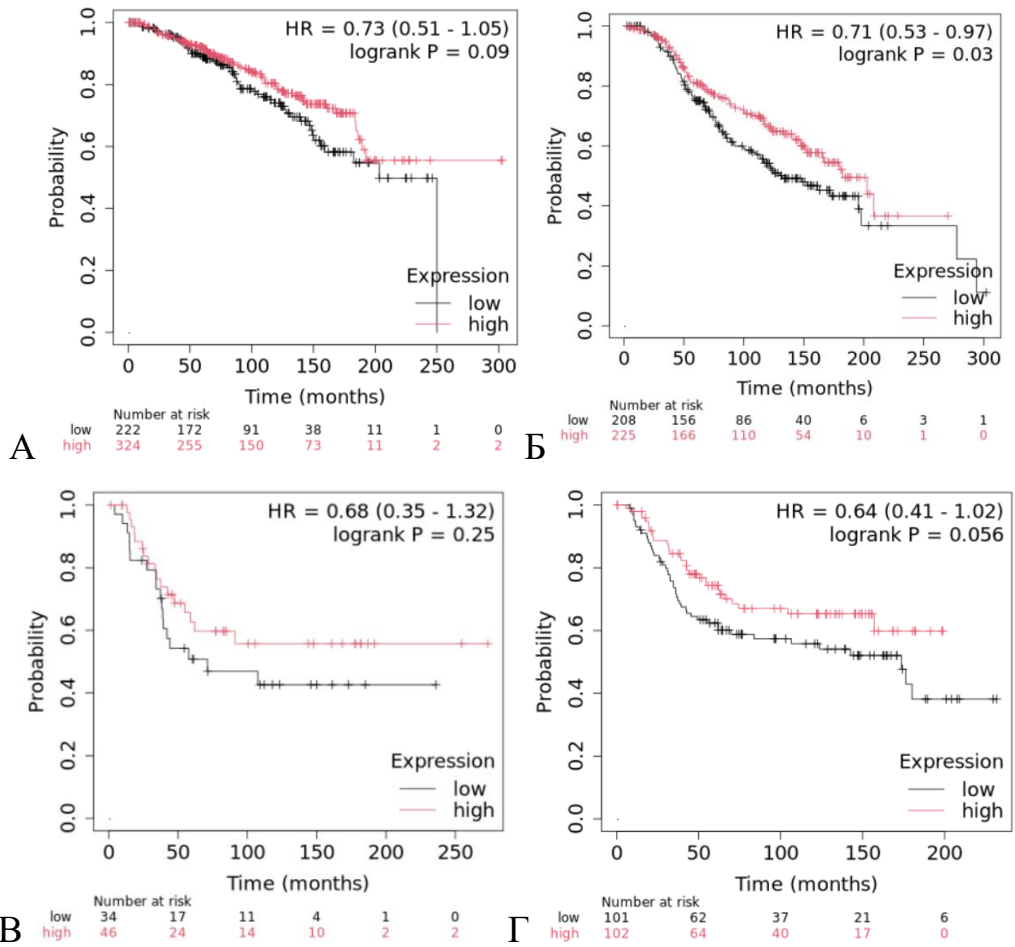


**Рис.5.14** Зв'язок рівнів експресії hsa-miR-186 у тканині пацієток, хворих на РГЗ із різними молекулярними підтипами

Подальший аналіз дозволив ідентифікувати прогностичне значення досліджуваних мікроРНК у хворих на РГЗ. Показано, що пацієтки із високими рівнями експресії мікроРНК-26b-5p характеризуються достовірно вищими на 20% ( $p < 0,05$ ) показниками загальної виживаності порівняно із хворими на РГЗ, в пухлинній тканині яких рівні цієї мікроРНК були низькими (рис.5.15). Аналогічну тенденцію зафіксовано у групі хворих на РГЗ люмінального Б молекулярного підтипу: хворі із високими показниками експресії мікроРНК-26b-5p мали на 25% достовірно вищі ( $p < 0,05$ ) значення загальної виживаності. Для пацієток із РГЗ люмінального А, HER2/neu-позитивного та потрійно негативного підтипів достовірної різниці в значеннях виживаності залежно від експресії мікроРНК-26b-5p не виявлено (рис.5.16.).

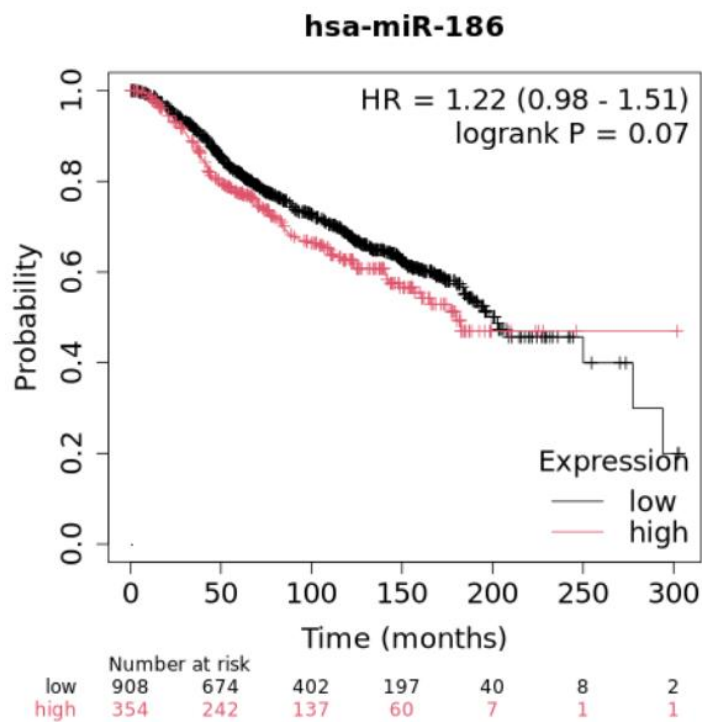


**Рис.5.15.** Показники загальної виживаності хворих на РГЗ, залежно від рівня експресії мікроРНК-26b

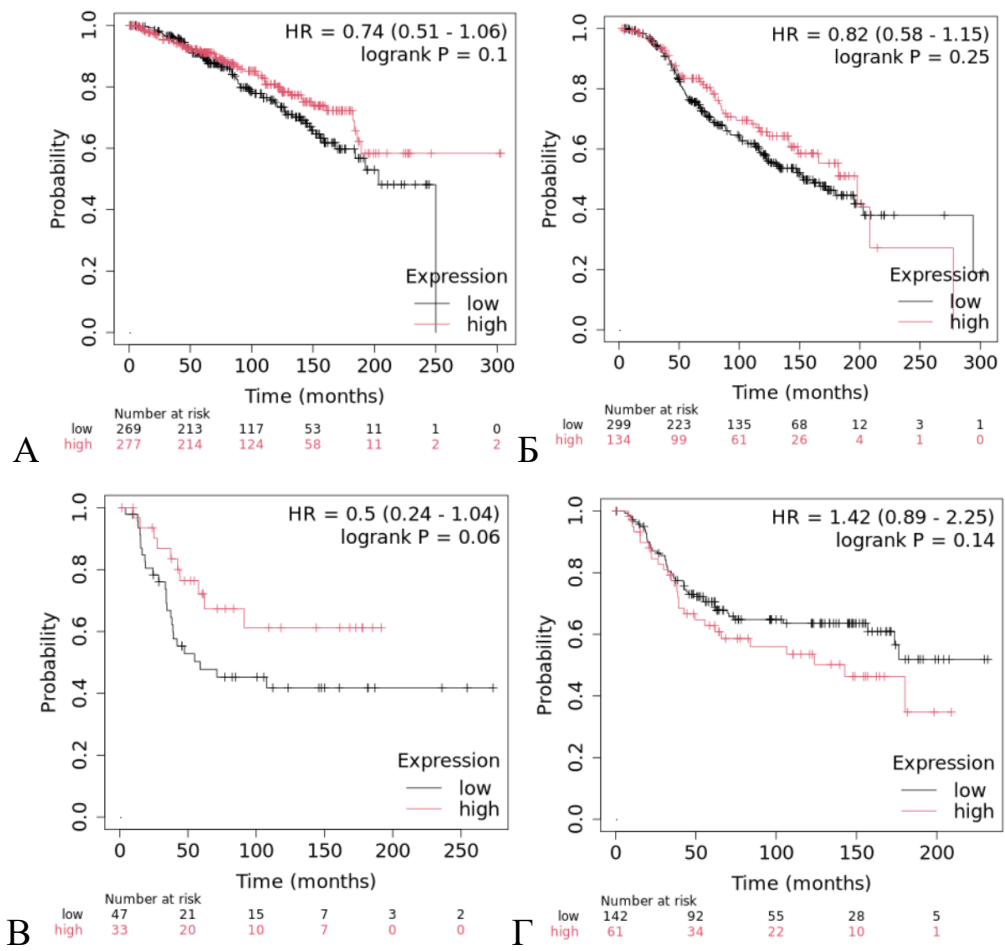


**Рис.5.16.** Показники загальної виживаності хворих на РГЗ люмінального А (А), люмінального Б (Б), HER2/неу-позитивного (В) та потрійно негативного (Г) молекулярного підтипу, залежно від рівня експресії мікроРНК-26b

Водночас, залежності загальної виживаності від рівнів експресії мікроРНК-186-5р у тканині РГЗ хворих загальної групи (рис.5.17.) та окремих молекулярних підтипів (рис.5.18.) не зафіксовано. Проте, варто зазначити про виявлену тенденцію до зростання періоду загальної виживаності у загальній групі хворих на РГЗ із нижчими рівнями експресії мікроРНК-186-5р ( $p=0,07$ ). В той же час при дослідженні вибірки хворих на люмінальний А та Б, а також HER2/neu-позитивний молекулярний підтип спостерігалися обернені залежності: хворі із вищими рівнями експресії мікроРНК-186-5р у тканині РГЗ мали тенденцію до зростання значень загальної виживаності без достовірної різниці ( $p=0,25$ ). Водночас у пацієток із потрійнонегативним РГЗ фіксувалася протилежна тенденція: нижчі рівні експресії мікроРНК-186-5р асоціювалися із вищими показниками виживаності без статистично значущої різниці.



**Рис.5.17.** Показники загальної виживаності хворих на РГЗ, залежно від рівня експресії мікроРНК-186



**Рис.5.18.** Показники загальної виживаності хворих на РГЗ люмінального А (А), люмінального Б (Б), HER2/neu-позитивного (В) та потрійно негативного (Г) молекулярного підтипу, залежно від рівня експресії мікроРНК-186

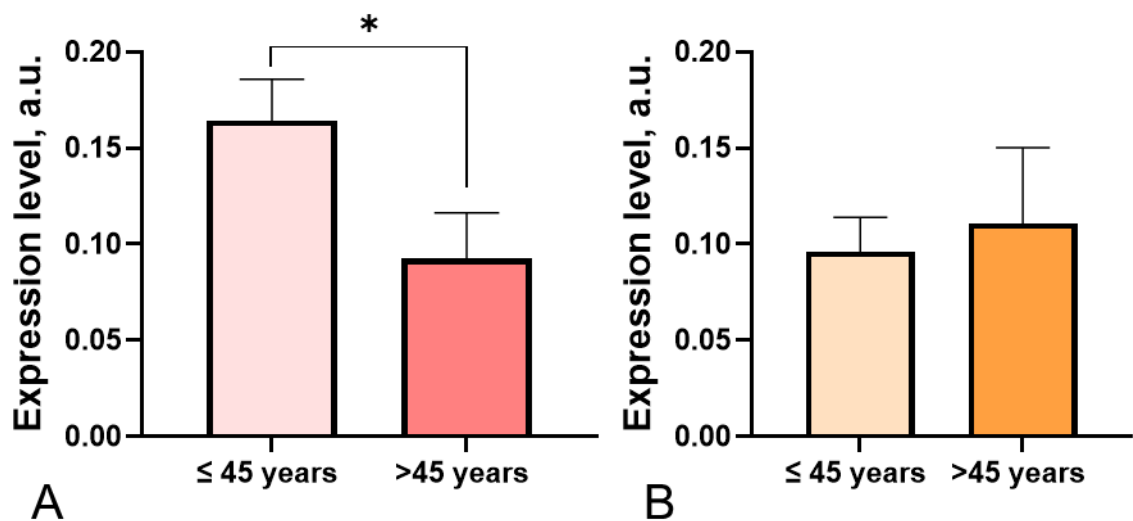
Відповідно, отримані результати доводять прогностичне значення досліджуваних мікроРНК у хворих на РГЗ. Доведено, що розвиток РГЗ супроводжується статистично значущим зниженням показників експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p. Показано, що пацієнтки із РГЗ люмінальних підтипів I-II стадій характеризуються достовірним підвищенням рівнів мікроРНК-26b-5p. Виявлено, що для хворих на ІЛС II стадії без діагностованого ураження лімфатичних вузлів притаманним є зниження рівнів мікроРНК-186-5p.

Показано, що підвищені рівні мікроРНК-26b-5p асоціюються із достовірно вищими показниками загальної виживаності у хворих загальної групи РГЗ, а

також із новоутвореннями грудної залози Люмінального Б молекулярного підтипу.

## 5.2. Дослідження зв'язку показників пухлино-асоційованих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у тканині РГЗ хворих із різним клінічним статусом з урахуванням віку

На першому етапі дослідження нами проведено оцінку експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у пухлинній тканині РГЗ хворих різних вікових груп (рис.5.19). Показано, що характерною особливістю РГЗ хворих віком до 45 років є достовірно вищі у 1,78 раза ( $p=0,0005$ ) рівні мікроРНК-26b-5p порівняно із рівнями у жінок, старших за 45 років. Водночас залежності рівня мікроРНК-186-5p у пухлинній тканині від віку хворих не зафіксовано.



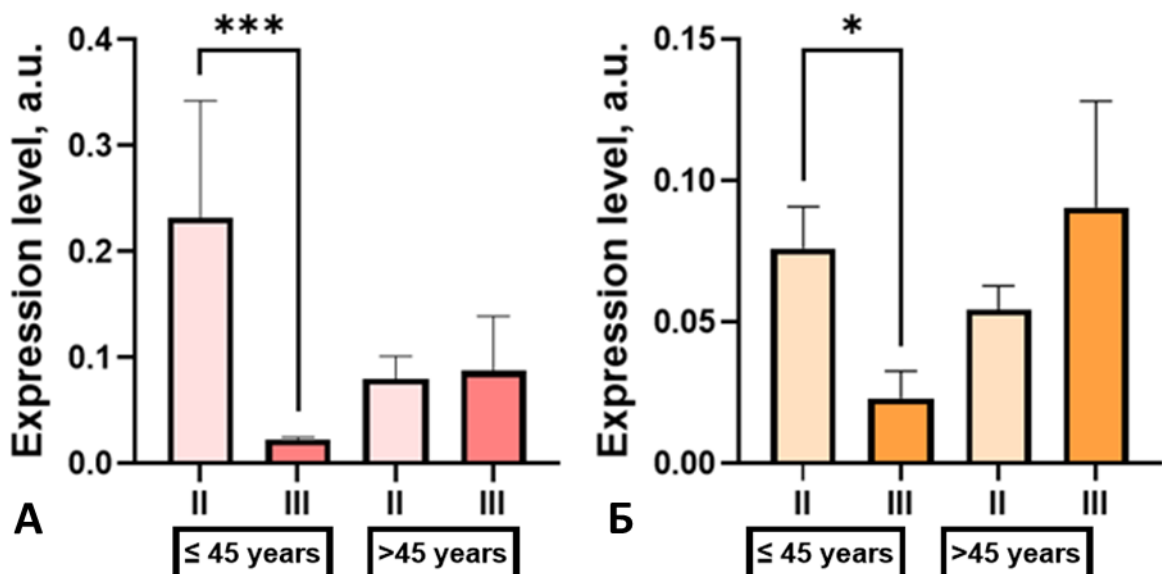
**Рис.5.19.** Зв'язок показників експресії пухлиноасоційованих мікроРНК-26b-5p (A) та мікроРНК-186-5p (B) із віком хворих на РГЗ

В подальшому для оцінки клінічного значення досліджуваних мікроРНК у пацієток різних вікових груп хворих було розподілено на 2 підгрупи: молодші та старші за 45 років. Встановлено, що у пухлинній хворих III стадію РГЗ

молодого віку відзначається зменшення у 10,14 ( $p=0,0003$ ) та 3,31 ( $p=0,0310$ ) разів відповідно рівня експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p порівняно із пацієнтами цієї вікової групи з II стадією пухлинного процесу (Рис.5.20.).

Статистично значущої різниці між показниками досліджуваних мікроРНК у хворих різних вікових груп залежно від ступеня диференціювання новоутворення не виявлено (рис.5.21.).

У тканині РГЗ хворих молодого віку категорії Т3 відзначено зниження рівнів мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у 4,34 ( $p=0,0163$ ) та 6,59 ( $p=0,0369$ ) разів порівняно із зразками пацієток категорії Т2 (Рис.5.22). Зменшення у 3,53 раза ( $p=0,0299$ ) показників мікроРНК-26b-5p також зафіксовано у зразках пухлинної тканини хворих молодого віку із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів (Рис.5.23).



**Рис.5.20.** Зв'язок показників експресії пухлиноасоційованих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (Б) зі стадією РГЗ

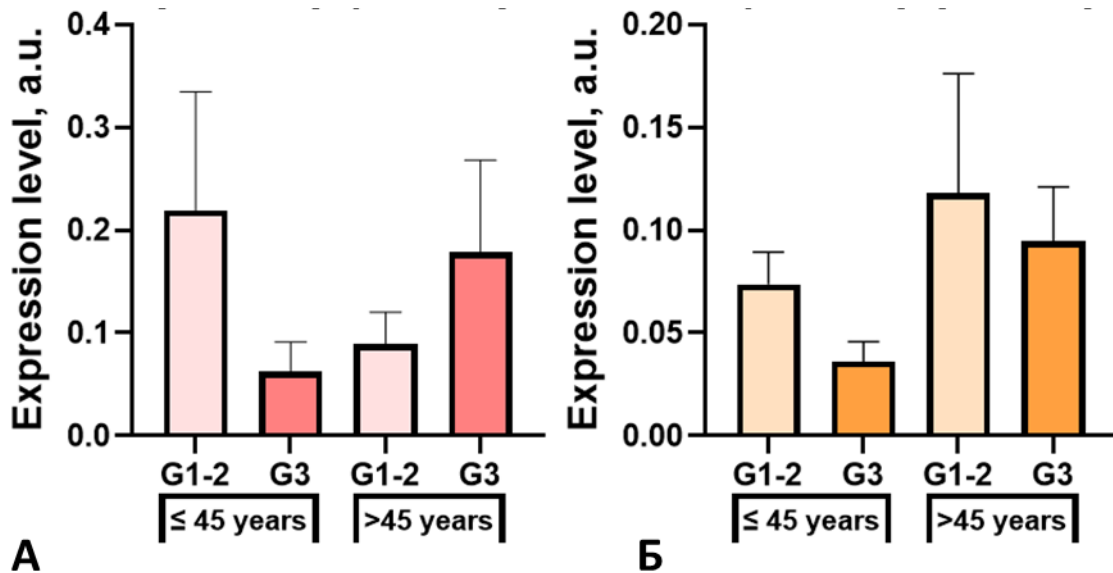


Рис.5.21. Зв'язок показників експресії пухлиноасоційованих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (Б) зі ступенем диференціювання РГЗ

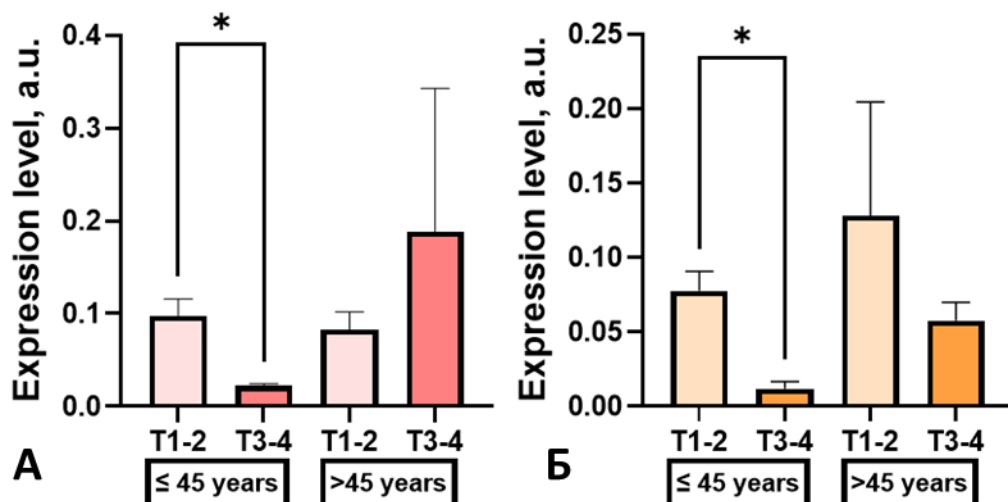
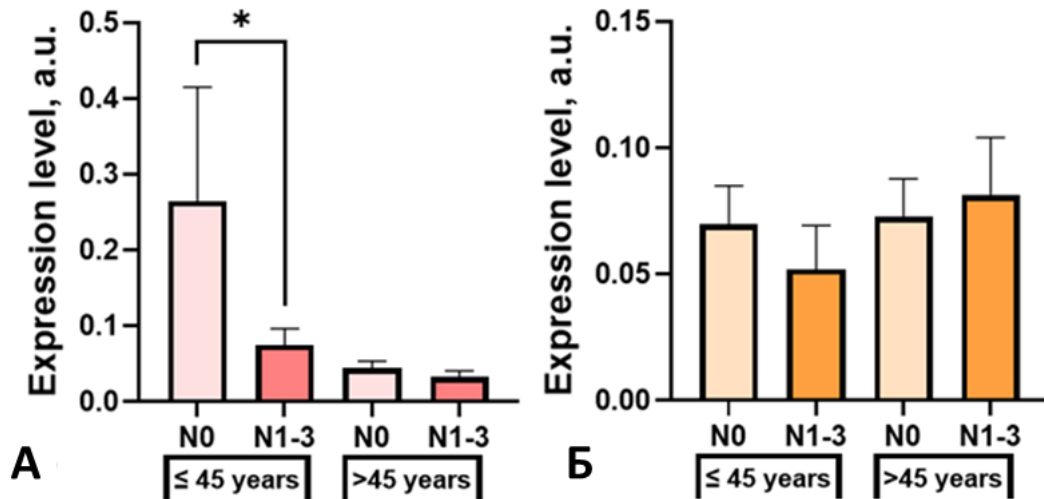
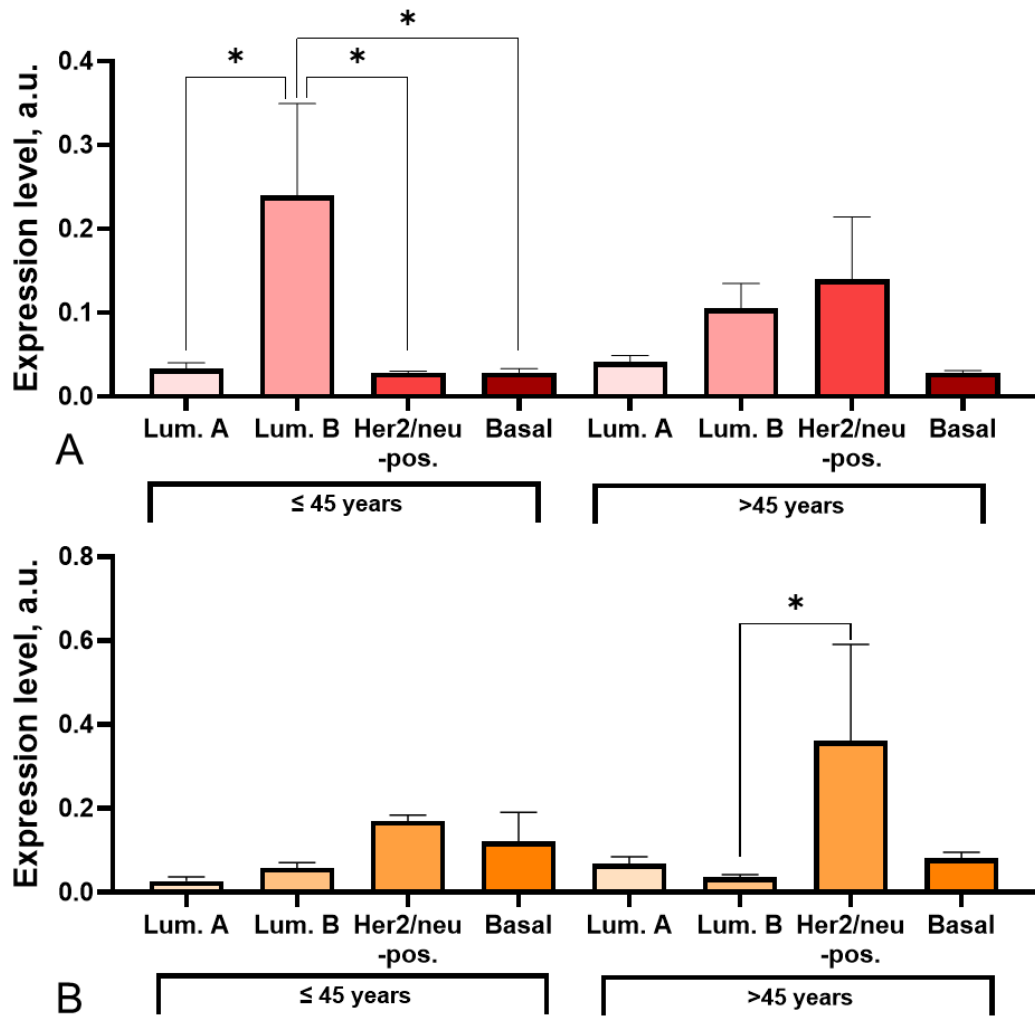


Рис.5.22. Зв'язок показників експресії пухлиноасоційованих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (Б) із розміром новоутворень (категорією Т) РГЗ



**Рис.5.23.** Зв'язок показників експресії пухлиноасоційованих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (Б) із статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (категорією N) РГЗ

Показано, що характерною ознакою Люмінального Б молекулярного підтипу РГЗ у жінок молодого віку є достовірне підвищення показників експресії мікроРНК-26b-5p у 7,26 ( $p=0,0476$ ), 8,40 ( $p=0,0376$ ) та 8,45 ( $p=0,0352$ ) разів відповідно порівняно із тканиною Люмінального А, HER2/neu-позитивного та базального молекулярних підтипів новоутворень. У тканині Her2/neu-позитивного РГЗ, старших за 45 років, зафіксовано підвищення у 2,9 ( $p=0.0278$ ) рази рівня мікроРНК-186-5p порівняно із зразками люмінального Б підтипу РГЗ пацієнток цієї вікової групи (рис.5.24).

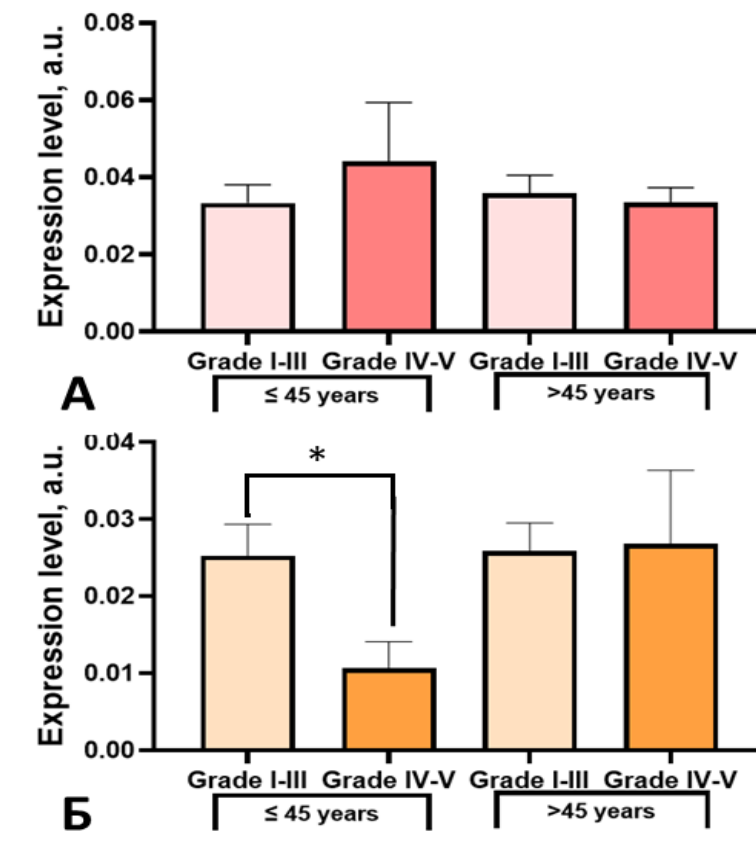


**Рис.5.24.** Зв'язок показників експресії пухлиноасоційованих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (Б) із молекулярним підтипом РГЗ

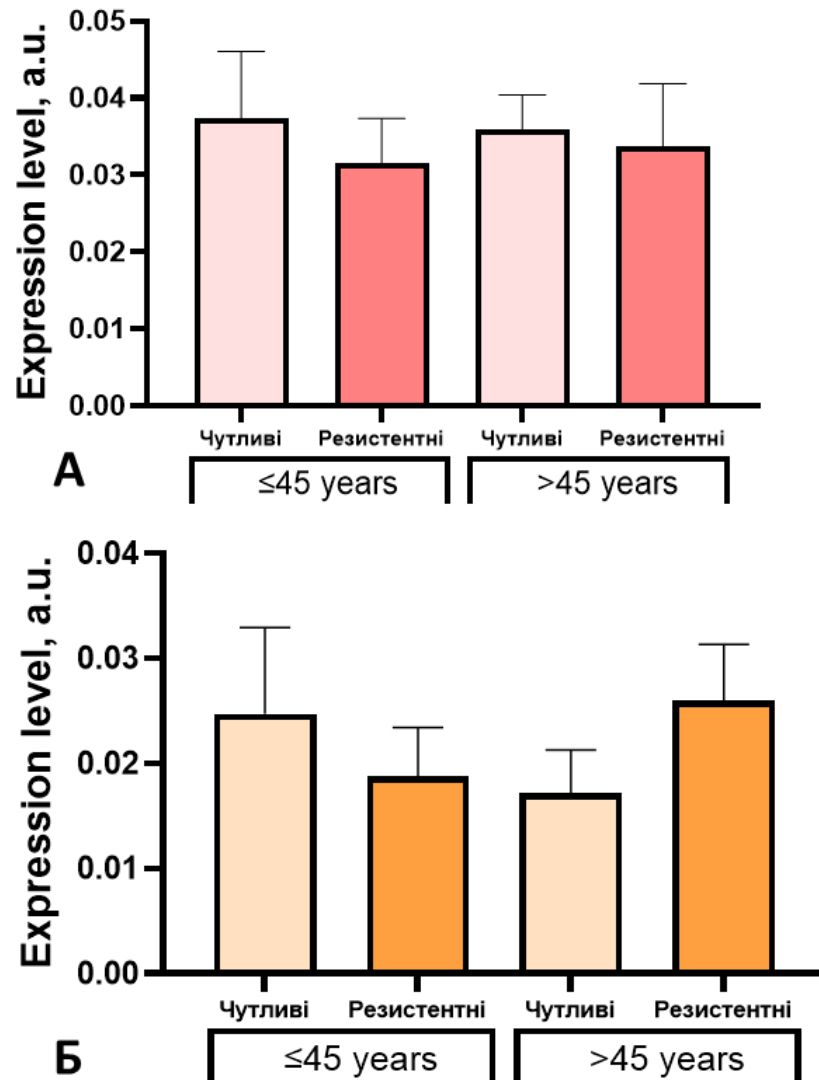
Узагальнюючи отримані результати, можна відзначити, що характерною ознакою РГЗ люмінального Б підтипу у хворих молодого віку є підвищення рівня пухлиноасоційованої мікроРНК-26b-5p. Зниження показників мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у молодих пацієнток асоційоване з більшим ступенем поширеності пухлинного процесу та з наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів, що може свідчити про їх залучення до механізмів прогресії захворювання. Ідентифіковане підвищення рівнів мікроРНК-186-5p у тканині Her2/neu-позитивного підтипу РГЗ жінок старшого віку вірогідно вказує на інший патерн її регуляції.

### 5.3. Значення пухлинно-асоційованих мікроРНК-26b-5р та мікроРНК-186-5р для прогнозування ефективності лікування хворих на РГЗ за схемою 4АС у неoad'ювантному режимі.

На наступному етапі нами проведено оцінку предиктивного значення досліджуваних мікроРНК для прогнозування ефективності НАС у режимі 4АС залежно від віку хворих. Показано, що тканина РГЗ молодих пацієнок, які були чутливими до лікування (Категорії IV-V відповідно до Miller-Payne) характеризувалася достовірним підвищенням рівня експресії мікроРНК-186-5р порівняно із хворими, нечутливими до терапії (категорії I-III відповідно до Miller-Payne) (Рис.5.25.). Водночас залежності рівнів експресії мікроРНК від чутливості до НПХТ, оціненої за системою RECIST1.1. не виявлено (рис.5.26.).



**Рис.5.25.** Рівні експресії мікроРНК-26b-5р та мікроРНК-186-5р у хворих на РГЗ різних вікових груп залежно від ступеня лікувального патоморфозу за Miller-Payne

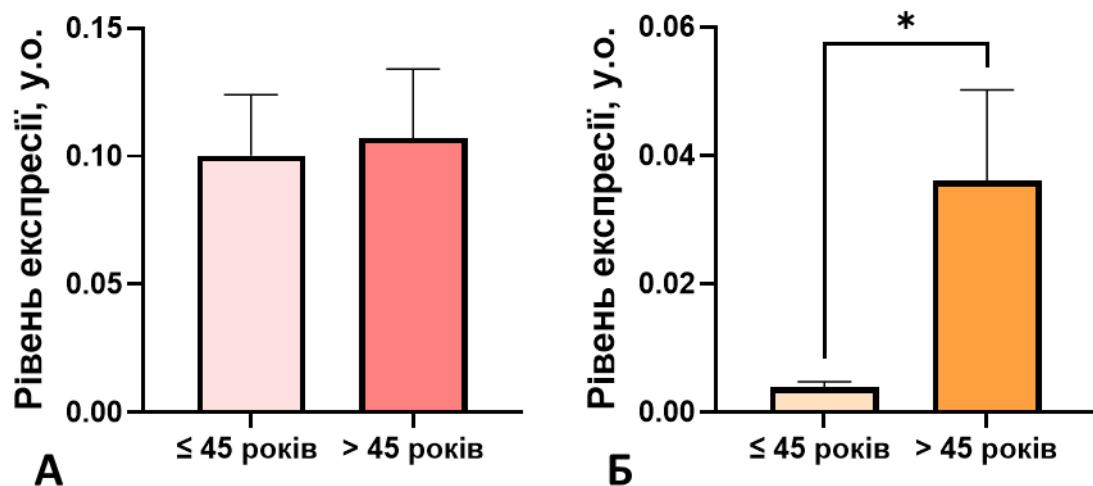


**Рис.5.26.** Рівні експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у хворих на РГЗ різних вікових груп залежно від чутливості до НПХТ за системою RECIST1.1.

Сукупність отриманих даних свідчить про вікову специфіку регуляції мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p і підкреслює їх потенційну роль як біомаркерів біологічних особливостей пухлини, її агресивності та чутливості до протипухлинного лікування.

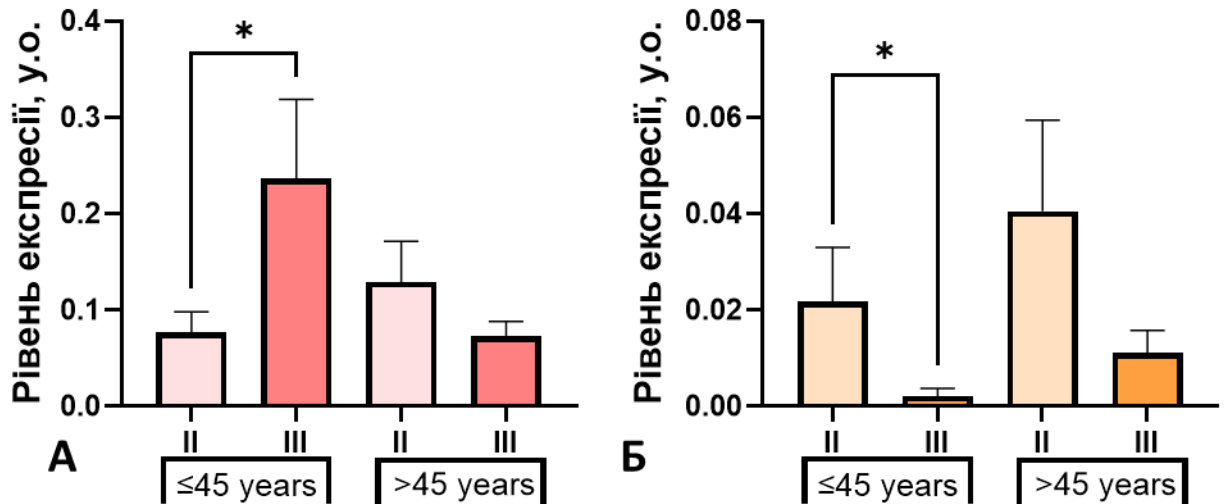
#### 5.4. Дослідження зв'язку показників циркулюючих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p із клінічним статусом хворих на РГЗ з урахуванням віку

На наступному етапі дослідження нами проведено оцінку прогностичного значення рівнів експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у сироватці хворих на РГЗ різних вікових груп. Показано, що характерною ознакою жінок молодого віку є достовірно нижчі у 9,38 раза ( $p < 0,05$ ) рівні експресії мікроРНК-186-5p порівняно із хворими, старшими за 45 років (рис.5.27).

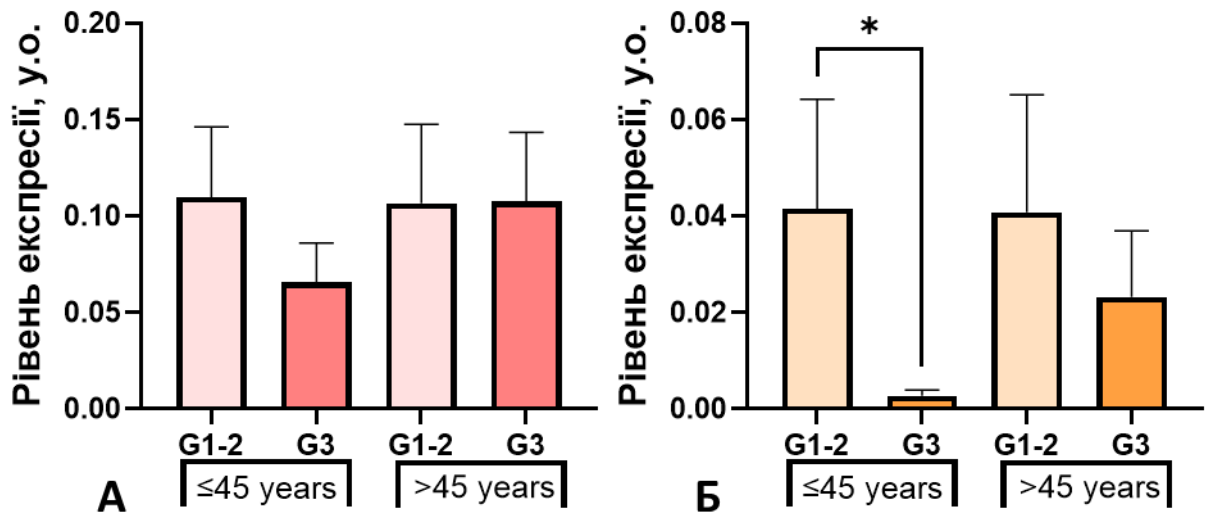


**Рис.5.27.** Зв'язок показників експресії циркулюючих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (В) із віком хворих на РГЗ

Виявлено, що у жінок, молодших за 45 років із 3 стадією пухлинного процесу спостерігається статистично значуще підвищення рівня експресії циркулюючої мікроРНК-26b-5p у 3,09 ( $p < 0,05$ ) разів на фоні зниження рівнів сироваткової мікроРНК-186-5p у 10,5 ( $p < 0,05$ ) разів порівняно із пацієнтками молодого віку, хворих на РГЗ 2 стадії (рис.5.28). Показано, що зниження ступеня диференціювання РГЗ у пацієток молодого віку асоціюється із падінням рівнів сироваткової мікроРНК-186-5p у 15,27 ( $p < 0,05$ ) разів порівняно із хворими на РГЗ помірного та високого ступеня диференціювання (рис.5.29.).



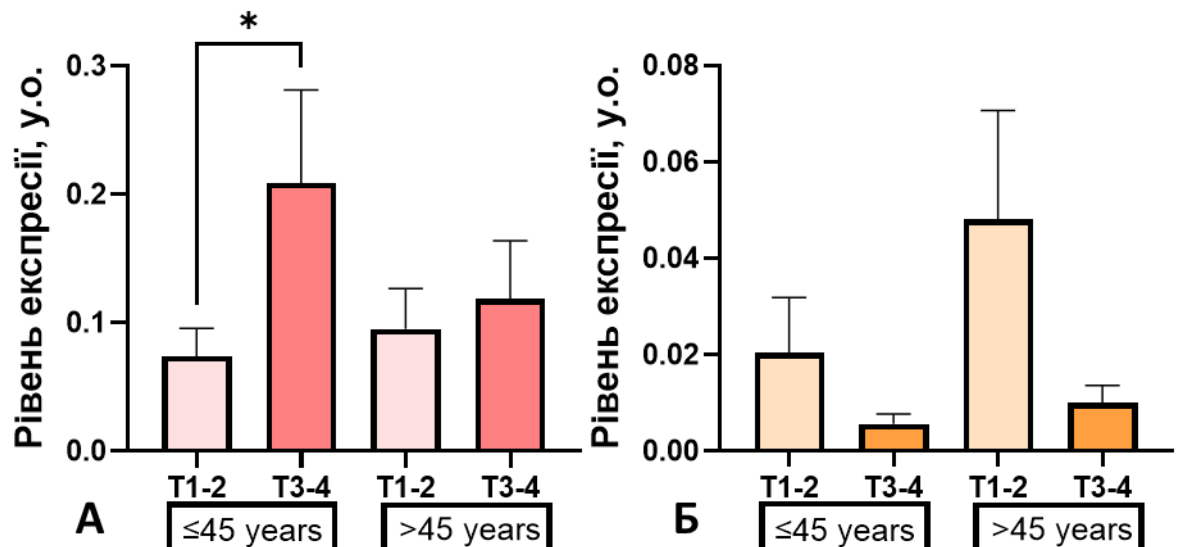
**Рис.5.28.** Зв'язок показників експресії циркулюючих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (В) із стадією пухлинного процесу



**Рис.5.29.** Зв'язок показників експресії циркулюючих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (В) із ступенем диференціювання РГЗ

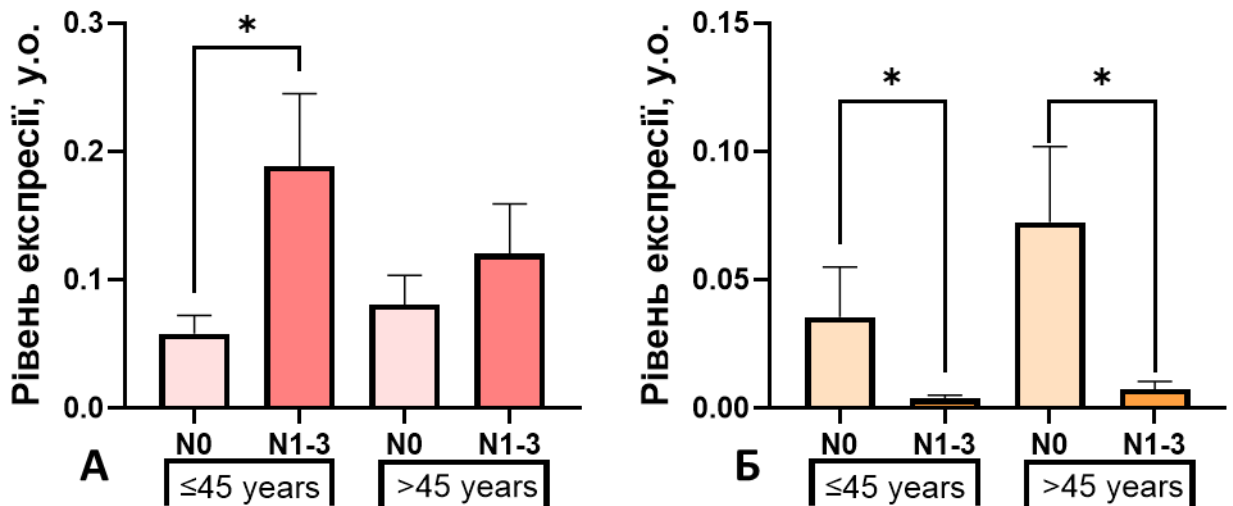
Встановлено достовірно вищі рівні мікроРНК-26b-5p у хворих молодого віку із більшими розмірами новоутворень. Так, жінки із РГЗ молодші за 45 років, із категорією Т3 чи Т4 мали в 2,82 ( $p < 0,05$ ) рази вищі рівні експресії цієї

мікроРНК. Залежності рівнів циркулюючих мікроРНК-186-5з від розміру пухлини у хворих різних вікових груп не зафіксовано (рис.5.30).



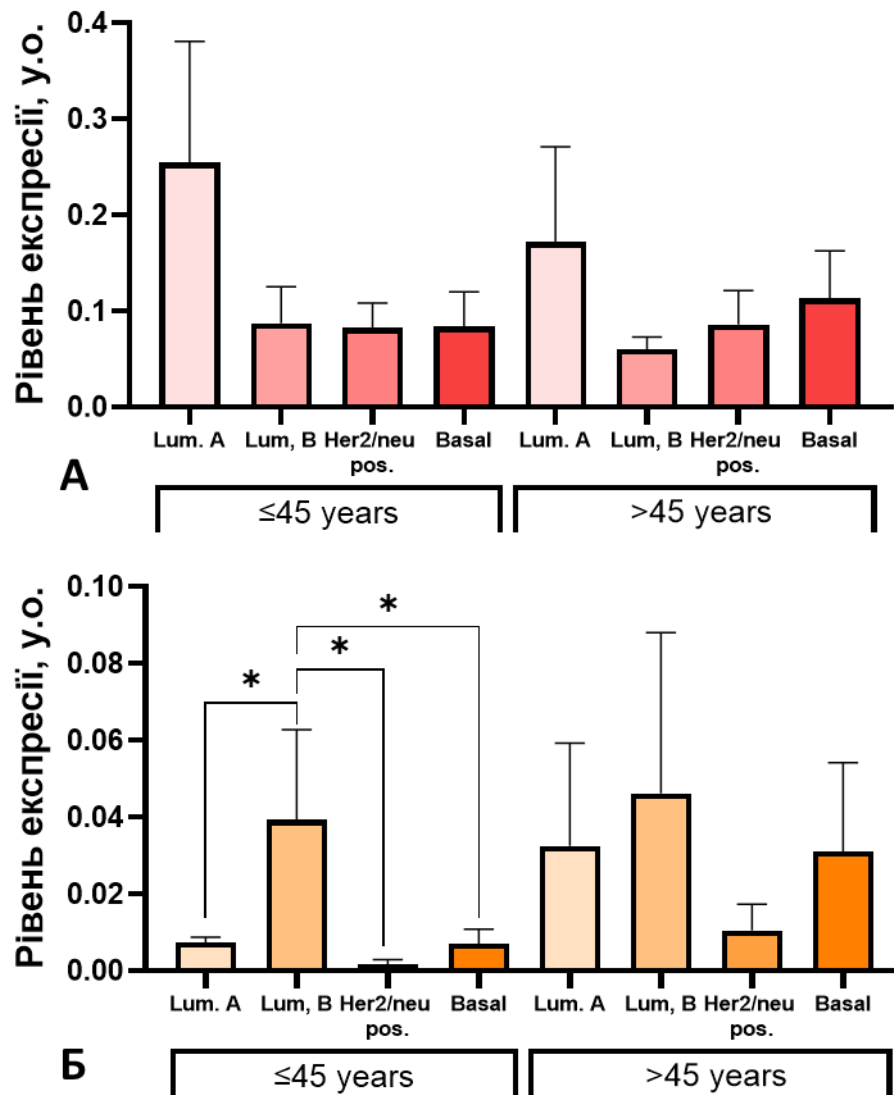
**Рис.5.30.** Зв'язок показників експресії циркулюючих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (В) із категорією Т

У ході дослідження зафіксовано зв'язок експресії мікроРНК-186-5p із статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів незалежно від віку пацієнток. В хворих обох вікових груп рівні циркулюючих мікроРНК-186-5p знижувалися (в 9,33 ( $p<0,05$ ) та 9,77 ( $p<0,05$ ) разів для хворих молодших та старших за 45 років відповідно) при виявленні пухлинного процесу у лімфатичних вузлах. Водночас молодим пацієнткам із РГЗ притаманне підвищення рівнів циркулюючої мікроРНК-26b-5p при ураженні регіонарних лімфатичних вузлів в 3,24 ( $p<0,05$ ) рази (рис.5.31).



**Рис.5.31.** Зв'язок показників експресії циркулюючих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (В) із категорією N

Показано, що характерною ознакою хворих на РГЗ молодого віку люмінального Б молекулярного підтипу було достовірне зростання експресії циркулюючої мікроРНК-186-5p порівняно із зразками крові хворих на люмінальний А (в 5,29 разів, ( $p < 0,05$ )), HER2/неу-позитивний (в 21,87 разів, ( $p < 0,05$ )) та базальний (в 5,51 разів, ( $p < 0,05$ )) РГЗ (рис.5.32).

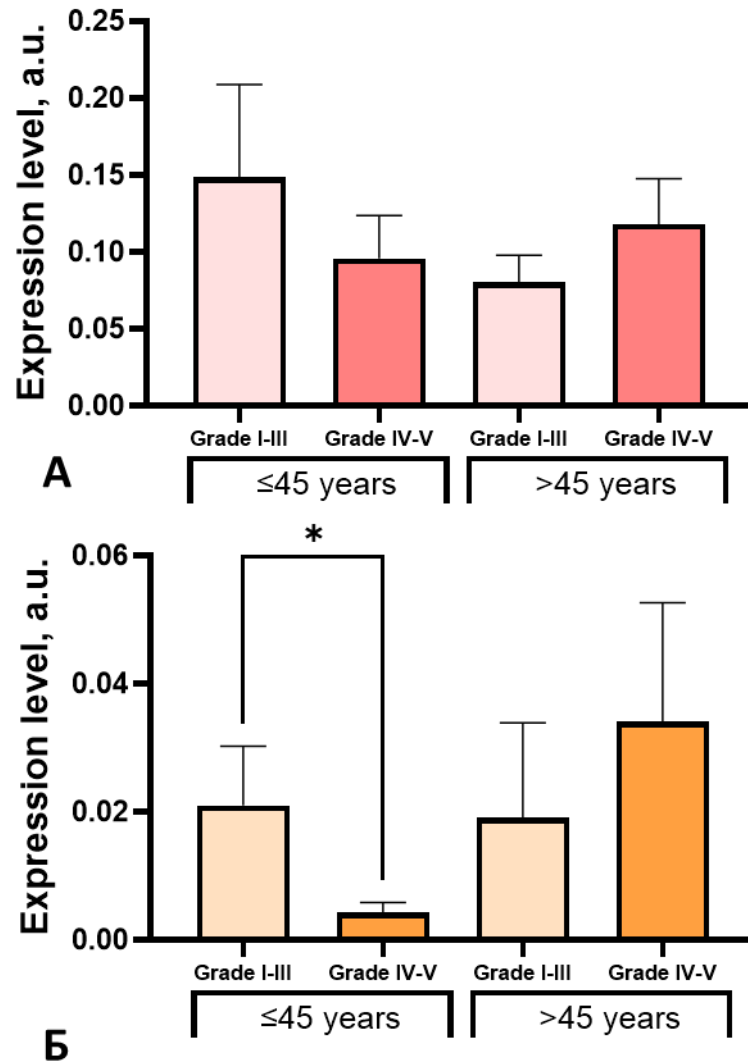


**Рис.5.32.** Зв'язок показників експресії циркулюючих мікроРНК-26b-5p (А) та мікроРНК-186-5p (В) із молекулярним підтипом РГЗ

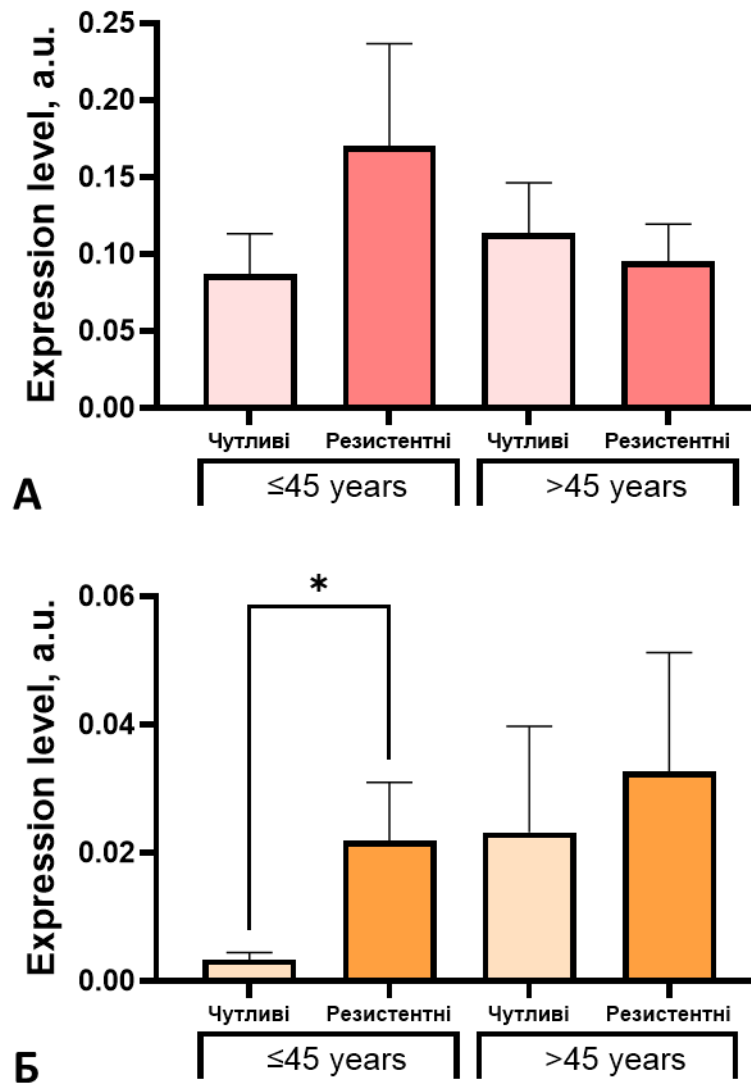
Отримані результати свідчать, що у жінок із РГЗ молодого віку із зростанням ступеня злоякісності спостерігається підвищення рівнів циркулюючої мікроРНК-26b-5p на фоні зниження експресії мікроРНК-186-5p. РГЗ люмінального Б підтипу у жінок до 45 років є статистично значуще підвищення рівнів циркулюючої мікроРНК-186-5p.

### **5.5. Предиктивне значення циркулюючих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у хворих на РГЗ , що проходили лікування за схемою 4AC у неоад'ювантному режимі**

Надалі нами проведено оцінку прогностичного значення експресії циркулюючих мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у хворих різних вікових груп при лікуванні РГЗ у неоад'ювантному режимі за схемою 4AC. Показано, що сироватка хворих на РГЗ молодого віку, резистентних до НПХТ характеризувалася достовірно нижчими показниками експресії мікроРНК-186-5p у та разів порівняно із сироваткою пацієнток, резистентних до антрациклінвмісної терапії за схемою 4AC за системами оцінки ефективності лікування RECOST 1.1. та за Miller-Payne відповідно (рис.5.33 та 5.34). Рівні експресії мікроРНК-186-5p у сироватці хворих, старших за 45 років, не мали сильного предиктивного значення при оцінці ефективності терапії РГЗ у неоад'ювантному режимі. Статистично значущої різниці у рівнях циркулюючої мікроРНК-26b-5p залежно від чутливості до НПХТ у хворих різних вікових груп не виявлено.



**Рис.5.33.** Рівні експресії мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у хворих на РГЗ різних вікових груп залежно від чутливості до НПХТ за Miller-Payne



**Рис.5.34.** Рівні експресії мікроРНК-26b-5р та мікроРНК-186-5р у хворих на РГЗ різних вікових груп залежно від чутливості до НПХТ за системою RECIST1.1.

Сукупність отриманих даних свідчить про вікову специфіку регуляції мікроРНК-26b-5р та мікроРНК-186-5р і підкреслює їх потенційну роль як молекулярних маркерів чутливості до протипухлинного лікування.

Результати проведених досліджень в розділі 5, опубліковано у [125, 126, 137].

## РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Робота спрямована на формування цілісного уявлення про вікові особливості біології РГЗ, роль пухлинного мікрооточення та потенціал його специфічних молекулярних маркерів у прогнозуванні перебігу захворювання та відповіді на терапію. Актуальність такого підходу визначається тим, що РГЗ залишається найпоширенішим злоякісним новоутворенням у жінок у світі та однією з провідних причин онкологічної смертності. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, щороку реєструються мільйони нових випадків РГЗ, при цьому значна частка летальних наслідків зумовлена саме прогресуванням і метастазуванням пухлинного процесу, а не первинною локалізованою пухлиною [117].

Епідеміологічні дані глобального проєкту GLOBOCAN, що реалізується Міжнародним агентством з дослідження раку (IARC), підтверджують стабільно високу захворюваність на РГЗ із тенденцією до зростання у більшості регіонів світу, включно з країнами з перехідною економікою [1]. Водночас особливу клінічну проблему становить РГЗ у молодих жінок, у яких захворювання часто характеризується більш агресивним перебігом, високою проліферативною активністю, менш сприятливим профілем відповіді на терапію та підвищеним ризиком раннього рецидиву. Саме ця когорта пацієнток привертає дедалі більшу увагу дослідників як група з потенційно відмінними біологічними механізмами канцерогенезу.

Сучасні міжнародні онкологічні рекомендації (ESMO, NCCN) підкреслюють, що традиційні клініко-морфологічні критерії (розмір пухлини, статус лімфатичних вузлів, ступінь диференціювання, експресія ER/PR/HER2 та Ki-67) не повністю відображають біологічну гетерогенність РГЗ і недостатні для точного прогнозування індивідуальної відповіді на терапію. У зв'язку з цим дедалі більшого значення набуває концепція пухлинного мікрооточення як активного регуляторного середовища, що визначає як прогресію пухлини, так і ефективність лікування. До ключових компонентів мікрооточення відносять

імунні клітини, цитокиново-хемокінові мережі, компоненти позаклітинного матриксу та сигнальні молекули, що забезпечують міжклітинну комунікацію та формування імунних ніш у пухлинному вузлі [4].

Особливе місце в сучасній онкобіології займають хемокіни, зокрема CXCL13, який бере участь у рекрутуванні В-лімфоцитів і формуванні третинних лімфоїдних структур у пухлинній тканині. Ці структури розглядаються як функціональний елемент протипухлинної імунної відповіді, але їх роль у різних підтипах РГЗ і в різних вікових групах залишається неоднозначною [7]. Паралельно з цим значну увагу привертають мікроРНК як посттранскрипційні регулятори експресії генів, які здатні одночасно контролювати цілі сигнальні мережі, включно з тими, що залучені до регуляції імунної відповіді, проліферації та ремоделювання мікрооточення [109].

З урахуванням зазначеного, у даному дослідженні особливий акцент зроблено на інтеграції даних щодо експресії CXCL13 та його регуляторних мікроРНК у контексті вікових особливостей РГЗ. Такий підхід є обґрунтованим, оскільки саме вікові відмінності можуть визначати різні шляхи активації пухлинного росту, різну імунну інфільтрацію та різну чутливість до неoad'ювантної поліхіміотерапії.

Важливою складовою сучасної онкології є також оцінка ефективності неoad'ювантної терапії, яка дозволяє не лише зменшити об'єм пухлини перед хірургічним втручанням, але й виступає *in vivo* моделлю чутливості пухлини до системного лікування. У цьому контексті патоморфологічна відповідь та RECIST-критерії залишаються базовими інструментами оцінки, однак їх прогностична точність може бути підвищена шляхом включення молекулярних маркерів.

Таким чином, комплекс проведених досліджень спрямований на узагальнення отриманих результатів у контексті сучасних уявлень про біологію РГЗ, із фокусом на вікову специфіку пухлинного процесу, роль CXCL13 як компонента імунного мікрооточення та значення регуляторних мікроРНК як потенційних предикторів перебігу захворювання і відповіді на терапію. Отримані

дані розглядаються крізь призму сучасної концепції персоналізованої онкології, яка передбачає перехід від морфологічної класифікації до багаторівневого молекулярного профілювання пухлин.

Таким чином, результати дослідження доводять, що зростання кількості CXCL13-позитивних малігнізованих клітин у пухлинному осередку хворих молодого віку асоціюється із III стадією пухлинного процесу, високим ступенем диференціювання, люмінальним Б та базальним молекулярними підтипами, а також високим ступенем патоморфозу після НПХТ за схемою 4АС.

Аналіз даних топології експресії CXCL13 у тканині РГЗ дозволив встановити, що цей білок експресується переважно трансформованими епітеліальними клітинами з чіткою цитоплазматичною локалізацією та вираженою внутрішньопухлинною гетерогенністю. Виявлений характер експресії узгоджується з даними досліджень, у яких CXCL13 розглядається як молекула, що може синтезуватися безпосередньо пухлинними клітинами, а не лише клітинами імунного мікрооточення РГЗ [112].

Виявлені вікові відмінності експресії CXCL13, зокрема зниження його показників у тканині РГЗ хворих молодшого віку порівняно зі старшою віковою групою, можуть відображати особливості біології пухлин у різних вікових когортах [115]. Водночас підвищення експресії CXCL13 у молодих пацієнток із III стадією захворювання свідчить про можливу участь цього хемокіну у процесах прогресії РГЗ.

Заслуговує на увагу детектована нами асоціація CXCL13 із молекулярними підтипами РГЗ. Найвища експресія CXCL13 була характерна для базальних та люмінальних Б підтипів РГЗ, які відрізняються підвищеною проліферативною активністю та більш агресивним перебігом пухлинного процесу [116]. Водночас люмінальний Б підтип демонстрував проміжні, але достовірно більші показники CXCL13 порівняно з люмінальним А, що може відображати проміжні біологічні властивості цього підтипу між гормонозалежними та більш агресивними формами РГЗ. CXCL13 у цьому контексті може виконувати роль медіатора локальної імунної організації, сприяючи рекрутуванню В-лімфоцитів та

формуванню імунних ніш у пухлинному осередку. Такий механізм узгоджується з даними літератури, де CXCL13 розглядається як маркер активованого імунного мікрооточення та третинних лімфоїдних структур, що частіше детектуються у біологічно агресивних, але, водночас, імунореактивних новоутвореннях грудної залози [112]. Низька експресія CXCL13 у люмінальному А підтипі РГЗ вірогідно обумовлено низьким проліферативним потенціалом та стабільним гормонозалежним фенотипом цих пухлин. Цікаво, що експресія CXCL13 у тканині РГЗ молодих пацієнок прямо залежала від ступеня лікувального патоморфозу після неoad'ювантної поліхіміотерапії за схемою 4АС. Це узгоджується з літературними даними, які вказують на потенційну роль CXCL13 як маркера чутливості пухлин до цитостатичної терапії, особливо у біологічно активних, високопроліферативних підтипах РГЗ [116].

У дослідженні вперше продемонструвано вікові особливості експресії hsa-miR-26b-5p та hsa-miR-186-5p у пацієнтів з РГЗ, а також їх потенціал як прогностичних маркерів у контексті відповіді на терапію на основі антрациклінів. Отримані дані узгоджуються з сучасним розумінням особливостей РГЗ у молодих жінок, тобто більш агресивною клінічною поведінкою, вищою поширеністю несприятливих молекулярних підтипів та схильністю до раннього системного поширення [4]. Характеристики експресії обох мікроРНК свідчать про їх потенційний вплив на вікові відповіді на терапію.

Підвищені рівні miR-26b-5p у люмінальному Б підтипі молодих пацієнтів можуть бути корисними, оскільки цей підтип зазвичай характеризується високою проліферативною активністю та схильністю до розвитку хіміорезистентності [8]. Зниження експресії miR-26b-5p у пухлинній тканині молодих пацієнтів з місцево-поширеним захворюванням (стадія III, T3) та метастазами в лімфатичні вузли узгоджується з даними літератури щодо її участі в контролі проліферації та епітеліально-мезенхімального переходу [8, 118]. У пухлинній тканині молодших пацієнтів, чутливих до неoad'ювантної терапії 4АС, спостерігалася вища експресія miR-186-5p порівняно зі старшими пацієнтами, які відповіли на лікування. Як повідомлялося раніше [9, 10], ця мікроРНК бере участь у регуляції

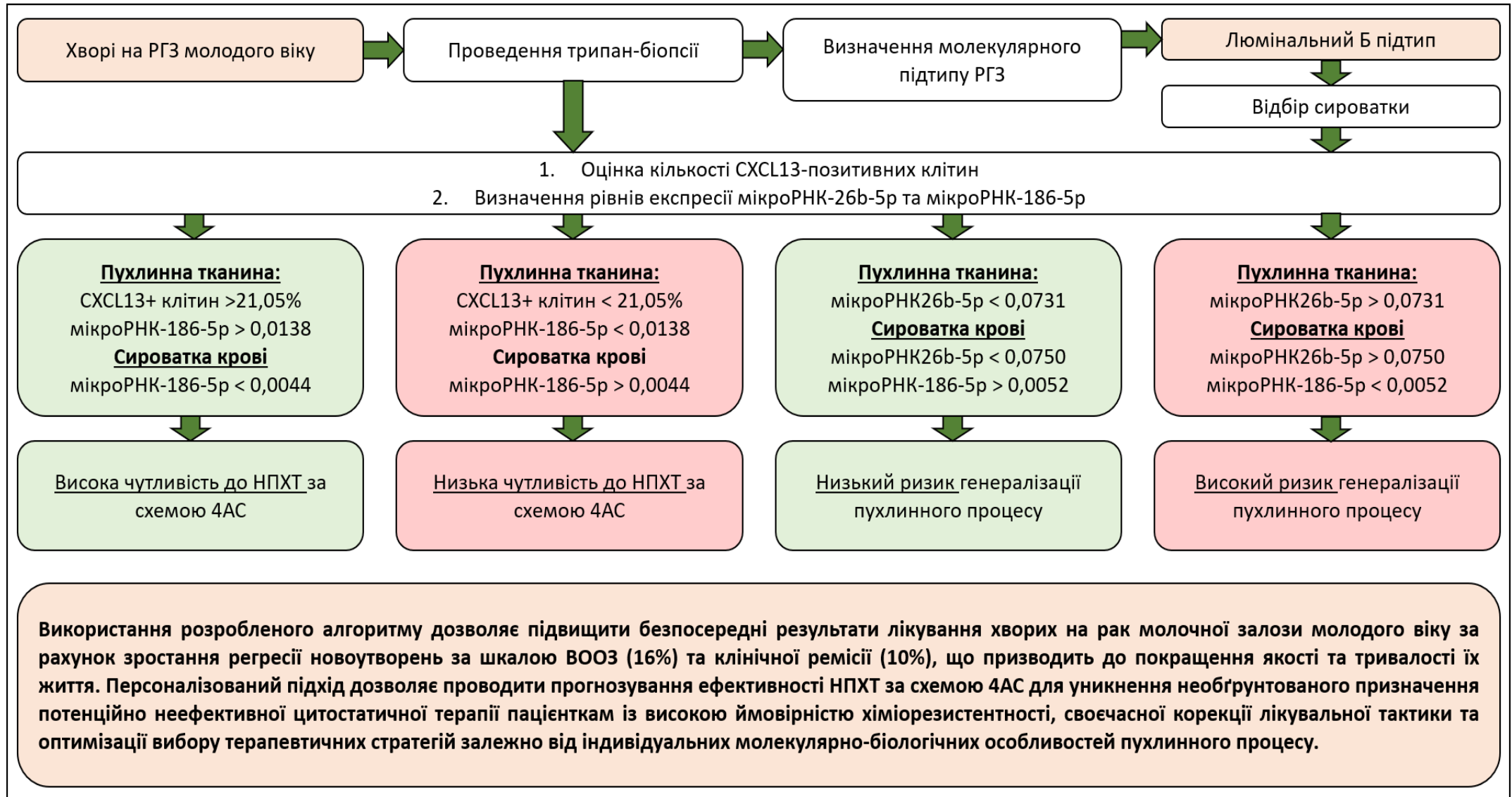
медикаментозної резистентності через вплив на транспортні білки та механізми репарації ДНК. Ймовірно, miR-186-5p може служити маркером чутливості до антрацикліну у молодих пацієнтів з РГЗ, тоді як її зниження може свідчити про розвиток резистентності.

Враховуючи отримані вище результати досліджень експресії молекулярних маркерів мікрооточення РГЗ молодого віку, наша увага на завершальному етапі була спрямована саме на когорту хворих із люмінальним Б молекулярним підтипом, який визнаний у всьому світі біологічно гетерогенним захворюванням, яке створює значні клінічні проблеми, особливо у молодих жінок. Мета-аналізи послідовно демонструють вищий ризик рецидиву та гірші показники виживання у пацієток з РГЗ люмінального Б молекулярного підтипу [36, 119]. Люмінальний Б підтип РГЗ вважається клінічно важливим через свою гетерогенність, високу проліферативну активність, частіший розвиток медикаментозної резистентності та гіршу відповідь на гормональну терапію, що відрізняє його від люмінального А підтипу. Серед молодих жінок (віком до 40 років) люмінальний Б підтип виявляється значно частіше, ніж у старших пацієнтів, і має гірший прогноз та показники виживання порівняно з іншими молекулярними підтипами. Наші дані узгоджуються з європейськими дослідженнями, які вказують на те, що молодий вік є незалежним несприятливим прогностичним фактором для РГЗ люмінального Б підтипу. Результати також узгоджуються з даними великих міжнародних проєктів, таких як METABRIC, plasmaMATCH та The Cancer Genome Atlas (TCGA), які вказують на значну внутрішньогрупову варіабельність у межах ER-позитивних пухлин [120, 121]. Зокрема, дослідження [122, 123] показали, що молодий вік пов'язаний з нижчими показниками безрецидивної виживаності та загальної виживаності, зокрема у пацієнтів з люмінальними підтипами РГЗ. Крім того, дослідження [124] показало, що у жінок молодше 40 років люмінальний підтип В пов'язаний з вищими показниками локорегіонального рецидиву після операції, що підкреслює необхідність розробки персоналізованого лікування та подальших підходів до молодих пацієток з цим підтипом раку грудної залози.

Враховуючи вищезазначене, важливо приділяти особливу увагу ранній діагностиці та індивідуалізації лікування люмінального Б підтипу РГЗ у молодих жінок для покращення прогнозу, підвищення рівня виживанності, та ефективності терапевтичних заходів, які застосовуються до хворих цієї когорти.

Враховуючи увесь масив отриманих експериментальних результатів, а також зміну парадигми сприйняття РГЗ люмінального Б молекулярного підтипу у хворих молодого віку настановує на потреби у розробці нових підходів для стратифікації діагностичних, прогностичних та терапевтичних підходів, які б враховували особливості клінічного статусу таких пацієнтів. Відповідно, завершальним етапом нашого дослідження стала розробка алгоритму роботи із пацієнтками молодого віку, хворими на РГЗ люмінального Б молекулярного підтипу (Рис.6.1.). Алгоритм дозволить формувати групи підвищеного ризику прогресування РГЗ молекулярного Б підтипу у хворих молодого віку, а також групи хворих, для яких проведення терапії за схемою 4АС у неoad'ювантному режимі буде неефективним.

**Рис. 6.1.** Алгоритм прогнозування перебігу захворювання та ефективності НПХТ за схемою 4АС у хворих молодого віку із РГЗ люмінального Б молекулярного підтипу.



## ВИСНОВКИ

Отримані результати дозволили розширити уявлення про молекулярний портрет РГЗ у пацієток молодого віку з урахуванням профілю експресії хемокіна CXCL13 та асоційованих із ним регуляторних мікроРНК26b-5p та мікроРНК-186-5p – біомаркерів, що мають високу прогностичну та предиктивну значимість. На підставі комплексного аналізу клінічних і молекулярно-генетичних даних розкрито їх роль у детермінації агресивного фенотипу пухлини. Результати роботи суттєво поглиблюють розуміння біології РГЗ у молодих жінок та формують підґрунтя для оптимізації прогнозування перебігу хвороби й розробки персоналізованих стратегій лікування.

1. Аналіз клініко-морфологічного профілю та віддалених результатів лікування хворих на РГЗ виявив чітку вікову залежність перебігу люмінального Б підтипу. Новоутворення пацієток віком до 40 років характеризуються високою частотою метастазування, низьким рівнем диференціації та підвищеним проліферативним індексом Ki-67. Попри вищу чутливість до неоад'ювантної поліхіміотерапії, молоді жінки (особливо віком <35 років) мають суттєво гірші показники загальної та безрецидивної виживаності, що обґрунтовує необхідність удосконалення протоколів лікування та персоналізації терапевтичної тактики.

2. Встановлено особливості експресії CXCL13 у хворих на РГЗ різних вікових груп: у пухлинній тканині хворих молодого віку кількість CXCL13-позитивних клітин є достовірно нижчою порівняно зі старшою віковою групою (на 10,9%;  $p < 0,05$ ). Найбільшу експресію CXCL13 зафіксовано у тканині РГЗ хворих молодого віку на III стадію захворювання, а також при базальному і люмінальному Б молекулярному підтипі новоутворень.

3. Доведено асоціацію показників експресії CXCL13 із ефективністю неоад'ювантної хіміотерапії у хворих на РГЗ молодого віку. Показано, що підвищена експресія CXCL13 у пухлинному осередку хворих молодого віку пов'язана з високим ступенем лікувального патоморфозу після неоад'ювантної поліхіміотерапії за схемою 4AC, що підтверджує предиктивне значення дослідженого хемокіну щодо ефективності лікування.

4. З'ясовано, що для хворих молодого віку був характерний вищий рівень експресії мікроРНК-26b-5p у пухлинній тканині та сироватці крові, тоді як рівень експресії мікроРНК-186-5p у сироватці крові є достовірно нижчий порівняно із таким у хворих старшої вікової групи. Доведено зв'язок між рівнем експресії досліджених мікроРНК із клініко-патологічними характеристиками РГЗ: стадією пухлинного процесу, категоріями T і N, ступенем диференціювання та молекулярним підтипом пухлини. Ідентифіковане підвищення рівня мікроРНК-26b-5p та мікроРНК-186-5p у хворих молодого віку з люмінальним Б підтипом РГЗ, вказує на їх залучення до формування біологічних особливостей цього варіанту пухлинного процесу.

5. На основі ретроспективного аналізу, а також проспективного дослідження розроблено алгоритм формування груп високого ризику прогресії РГЗ люмінального Б молекулярного підтипу, що може бути використаний для індивідуалізації лікування та моніторингу перебігу захворювання у пацієнок молодого віку. Застосування розробленого алгоритму дозволяє підвищити безпосередні результати лікування хворих на РГЗ молодого віку за рахунок зростання регресії новоутворень за шкалою ВООЗ (16%) та клінічної ремісії (10%), що призводить до покращення якості та тривалості їх життя.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics (2020): GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209–249.
2. Fedorenko Z, Soumkina O, Gorokh Ye, et al. Cancer in Ukraine (2020)-2021: Incidence, mortality, prevalence and other relevant statistics. *Bull Nat Cancer Registry Ukr* 2022; 23: 89.
3. Eiriz IF, Vaz Batista M, Cruz Tomás T, et al. Breast cancer in very young women-a multicenter 10-year experience. *ESMO Open.* (2021);6:100029.. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2020.100029>
4. Chekhun V, Martynyuk O, Lukianova Y, et al. Features of breast cancer in patients of young age: search for diagnosis optimization and personalized treatment. *Exp Oncol.* (2023);45(2):139–150.. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.02.139>
5. Balkwill F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer.* (2004);4(7):540–50.
6. Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. B cell-attracting chemokine 1, a human CXC chemokine expressed in lymphoid tissues. *J Exp Med.* (1998);187(4):655–60.
7. Sautès-Fridman C, Petitprez F, Calderaro J, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* (2019);16(6):343–58.
8. Ma S, Wei H, Wang C, Han J, Chen X, Li Y. miR-26b-5p inhibits cell proliferation and EMT by targeting MYCBP in triple-negative breast cancer. *Cell Mol Biol Lett.* (2021);26(1):52.. <https://doi.org/10.1186/s11658-021-00288-3>
9. Lu Q, Chen W, Ji Y, et al. Ursolic acid enhances cytotoxicity of doxorubicin-resistant triple-negative breast cancer cells via ZEB1-AS1/miR-186-5p/ABCC1 axis. *Cancer Biother Radiopharm.* (2021);37:673.. <https://doi.org/10.1089/cbr.2020.4147>

10. Zhang C, et al. Lnc00462717 regulates the permeability of the blood–brain tumor barrier through interaction with PTBP1 to inhibit the miR-186-5p/Occludin signaling pathway. *FASEB J.* (2020);34(8):9941–9958.. <https://doi.org/10.1096/fj.202000045R>
11. Kay C, Martínez-Pérez C, Meehan J, et al. Current trends in the treatment of HR+/HER2+ breast cancer. *Future Oncol.* (2021);17(13):1665-1681.. <https://doi.org/10.2217/fon-2020-0504>
12. Trapani D, Ginsburg O, Fadelu T, et al. Global challenges and policy solutions in breast cancer control. *Cancer Treat Rev.* (2022);104:102339.. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2022.102339>
13. Grybach SM, Polishchuk LZ, Chekhun VF. Analysis of the survival of patients with breast cancer depending on age, molecular subtype of tumor and metabolic syndrome. *Exp Oncol.* (2018);40(3):243-248.
14. Lei S, Zheng R, Zhang S, et al. Global patterns of breast cancer incidence and mortality: A population-based cancer registry data analysis from (2000) to 2020. *Cancer Commun (Lond).* 2021;41(11):1183-1194.. <https://doi.org/10.1002/cac2.12207>
15. Adomas AB, Grimm SA, Malone C, et al. Breast tumor specific mutation in GATA3 affects physiological mechanisms regulating transcription factor turnover. *BMC Cancer.* (2014);14:278.. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-278>
16. Vollmer Dahlke D, Yoshikawa A, McAdam M, et al. An Analysis of Health Care Team Communication Needs Among Younger vs Older Breast Cancer Survivors: Web-Based Survey. *JMIR Cancer.* (2022);8(1):e31118.. <https://doi.org/10.2196/31118>
17. Corey B, Smania MA, Spotts H, et al. Young Women With Breast Cancer: Treatment, Care, and Nursing Implications. *Clin J Oncol Nurs.* (2020);24(2):139-147.. <https://doi.org/10.1188/20.CJON.139-147>
18. Nguyen B, Venet D, Azim HA Jr, et al. Breast cancer diagnosed during pregnancy is associated with enrichment of non-silent mutations, mismatch repair deficiency signature and mucin mutations. *NPJ Breast Cancer.* (2018);4:23.. <https://doi.org/10.1038/s41523-018-0077-3>

19. Anders CK, Johnson R, Litton J, et al. Breast cancer before age 40 years. *Semin Oncol.* (2009);36(3):237-249.. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2009.03.001>
20. Tabbal M, Hachim MY, Jan RK, Adrian TE. Using publicly available datasets to identify population-based transcriptomic landscape contributing to the aggressiveness of breast cancer in young women. *Front Genet.* (2023);13:1039037. Published 2023 Jan 4.. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1039037>
21. Lee HB, Han W. Unique features of young age breast cancer and its management. *J Breast Cancer.* (2014);17(4):301-307.. <https://doi.org/10.4048/jbc.2014.17.4.301>
22. Dyussenbayev, A. Age Periods Of Human Life. *Advances in Social Sciences Research Journal.* (2017);4(6).. <https://doi.org/10.14738/assrj.46.2924>
23. Zou J, Qin W, Yang L, et al. Genetic alterations and expression characteristics of ARID1A impact tumor immune contexture and survival in early-onset gastric cancer. *Am J Cancer Res.* (2020);10(11):3947-3972.
24. Gabriel CA, Domchek SM. Breast cancer in young women. *Breast Cancer Res.* (2010);12(5):212.. <https://doi.org/10.1186/bcr2647>
25. Paluch-Shimon S, Cardoso F, Partridge AH, et al. ESO-ESMO 4th International Consensus Guidelines for Breast Cancer in Young Women (BCY4). *Ann Oncol.* (2020);31(6):674-696.. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.03.284>
26. Johnson RH, Anders CK, Litton JK, et al. Breast cancer in adolescents and young adults. *Pediatr Blood Cancer.* (2018);65(12):e27397.. <https://doi.org/10.1002/pbc.27397>
27. Bleyer WA. Cancer in older adolescents and young adults: epidemiology, diagnosis, treatment, survival, and importance of clinical trials. *Med Pediatr Oncol.* (2002);38(1):1-10.. <https://doi.org/10.1002/mpo.1257>
28. Fabiano V, Mandó P, Rizzo M, et al. Breast Cancer in Young Women Presents With More Aggressive Pathologic Characteristics: Retrospective Analysis From an Argentine National Database. *JCO Glob Oncol.* (2020);6:639-646.. <https://doi.org/10.1200/JGO.19.00228>

29. Sun H, Huang W, Ji F, et al. Comparisons of Metastatic Patterns, Survival Outcomes and Tumor Immune Microenvironment Between Young and Non-Young Breast Cancer Patients. *Front Cell Dev Biol.* (2022);10:923371. Published 2022 Jul 14.. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.923371>
30. Sarker R, Islam MS, Moonajilin MS, Rahman M, Gesesew HA, Ward PR. Effectiveness of educational intervention on breast cancer knowledge and breast self-examination among female university students in Bangladesh: a pre-post quasi-experimental study. *BMC Cancer.* (2022);22(1):199. Published 2022 Feb 22.. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09311-y>
31. Hales CM, Carroll MD, Fryar CD, et al. Prevalence of Obesity and Severe Obesity Among Adults: United States, (2017)-2018. *NCHS Data Brief.* 2020;(360):1-8.
32. Kelly T, Yang W, Chen CS, et al. Global burden of obesity in (2005) and projections to 2030. *Int J Obes (Lond).* 2008;32(9):1431-1437.. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.102>
33. Dong S, Wang Z, Shen K, et al. Metabolic Syndrome and Breast Cancer: Prevalence, Treatment Response, and Prognosis. *Front Oncol.* (2021);11:629666. Published 2021 Mar 25.. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.629666>
34. Weichhaus M, Broom J, Wahle K, et al. A novel role for insulin resistance in the connection between obesity and postmenopausal breast cancer. *Int J Oncol.* (2012);41(2):745-752.. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1480>
35. Lykhova O, Zavelevich M, Philchenkov A, et al. Does insulin make breast cancer cells resistant to doxorubicin toxicity? [published online ahead of print, (2023) May 25]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2023;10.1007/s00210-023-02516-3.. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02516-3>
36. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, et al. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel).* (2021);13(17):4287. Published 2021 Aug 25.. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>

37. Berger NA. Young Adult Cancer: Influence of the Obesity Pandemic. *Obesity* (Silver Spring). (2018);26(4):641-650.. <https://doi.org/10.1002/oby.22137>
38. Pellegata NS, Berriel Diaz M, Rohm M, et al. Obesity and cancer-extracellular matrix, angiogenesis, and adrenergic signaling as unusual suspects linking the two diseases. *Cancer Metastasis Rev.* (2022);41(3):517-547.. <https://doi.org/10.1007/s10555-022-10058-y>
39. Mavaddat N, Antoniou AC, Easton DF, et al. Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol.* (2010);4(3):174-191.. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.011>
40. Copson ER, Maishman TC, Tapper WJ, et al. Germline BRCA mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study. *Lancet Oncol.* (2018);19(2):169-180.. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30891-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30891-4)
41. Andrieu N, Goldgar DE, Easton DF, et al. Pregnancies, breast-feeding, and breast cancer risk in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study (IBCCS). *J Natl Cancer Inst.* (2006);98(8):535-544.. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj132>
42. Allouch S, Gupta I, Malik S, et al. Breast Cancer During Pregnancy: A Marked Propensity to Triple-Negative Phenotype. *Front Oncol.* (2020);10:580345. Published 2020 Dec 23.. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.580345>
43. American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures (2011)-2012.* Atlanta: American Cancer Society, Inc.
44. Osorio A, de la Hoya M, Rodríguez-López R, et al. Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer. *Int J Cancer.* (2002);99(2):305-309.. <https://doi.org/10.1002/ijc.10337>
45. Gargallo P, Yáñez Y, Segura V, et al. Li-Fraumeni syndrome heterogeneity. *Clin Transl Oncol.* (2020);22(7):978-988.. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02236-2>
46. Malkin D. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer.* (2011);2(4):475-484.. <https://doi.org/10.1177/1947601911413466>

47. Magaña M, Landeta-Sa AP, López-Flores. Cowden Disease: A Review. *Am J Dermatopathol.* (2022);44(10):705-717.. <https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000002234>
48. Tacheci I, Kopacova M, Bures J. Peutz-Jeghers syndrome. *Curr Opin Gastroenterol.* (2021);37(3):245-254.. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000718>
49. Takaku M, Grimm SA, De Kumar B, et al. Cancer-specific mutation of GATA3 disrupts the transcriptional regulatory network governed by Estrogen Receptor alpha, FOXA1 and GATA3. *Nucleic Acids Res.* (2020);48(9):4756-4768.. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa179>
50. Khazaeli Najafabadi M, Mirzaeian E, Memar Montazerin S, et al. Role of GATA3 in tumor diagnosis: A review. *Pathol Res Pract.* (2021);226:153611.. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2021.153611>
51. Martin EM, Orlando KA, Yokobori K, et al. The estrogen receptor/GATA3/FOXA1 transcriptional network: lessons learned from breast cancer. *Curr Opin Struct Biol.* (2021);71:65-70.. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.05.015>
52. Cohen H, Ben-Hamo R, Gidoni M, et al. Shift in GATA3 functions, and GATA3 mutations, control progression and clinical presentation in breast cancer. *Breast Cancer Res.* (2014);16(6):464. Published 2014 Nov 20.. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0464-0>
53. Zhang X, Zhang Y, Zhao J, et al. ARID1A mutations in cancer development: mechanism and therapy. *Carcinogenesis.* (2023);44(3):197-208.. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgad011>
54. Waks AG, Kim D, Jain E, et al. Somatic and Germline Genomic Alterations in Very Young Women with Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* (2022);28(11):2339-2348.. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-21-2572>
55. Lin YF, Tseng IJ, Kuo CJ, et al. High-level expression of ARID1A predicts a favourable outcome in triple-negative breast cancer patients receiving paclitaxel-based chemotherapy. *J Cell Mol Med.* (2018);22(4):2458-2468.. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13551>

56. Natrajan R, Sailem H, Mardakheh FK, et al. Microenvironmental Heterogeneity Parallels Breast Cancer Progression: A Histology-Genomic Integration Analysis. *PLoS Med.* (2016);13(2):e1001961. Published 2016 Feb 16.. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001961>
57. Vangangelts KMH, Kramer CJH, Bastiaannet E, et al. The intra-tumoural stroma in patients with breast cancer increases with age. *Breast Cancer Res Treat.* (2020);179(1):37-45.. <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05422-6>
58. Guo Q, Sun D, Barrett AS, et al. Mammary collagen is under reproductive control with implications for breast cancer. *Matrix Biol.* (2022);105:104-126.. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2021.10.006>
59. Bahcecioglu G, Yue X, Howe E, et al. Aged Breast Extracellular Matrix Drives Mammary Epithelial Cells to an Invasive and Cancer-Like Phenotype. *Adv Sci (Weinh).* (2021);8(22):e2100128.. <https://doi.org/10.1002/advs.202100128>
60. Soysal SD, Tzankov A, Muenst SE. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology.* (2015);82(3-4):142-152.. <https://doi.org/10.1159/000430499>
61. Lukianova N, Zadvornyi T, Mushii O, et al. Evaluation of diagnostic algorithm based on collagen organization parameters for breast tumors. *Exp Oncol.* (2022);44(4):281-286.. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-4.19137>
62. Têtu B, Brisson J, Wang CS, et al. The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res.* (2006);8(3):R28.. <https://doi.org/10.1186/bcr1503>
63. Lukianova N, Mushii O, Borikun T, et al. Pattern of MMP2 and MMP9 expression depends on breast cancer patients' age. *Exp Oncol.* (2023);45(1):17-27. Published 2023 Jun 26.. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.01.017>
64. Gao Y, Samreen N, Heller SL. Non-BRCA Early-Onset Breast Cancer in Young Women. *Radiographics.* (2022);42(1):5-22.. <https://doi.org/10.1148/rg.210109>

65. Partridge AH, Hughes ME, Warner ET, et al. Subtype-Dependent Relationship Between Young Age at Diagnosis and Breast Cancer Survival. *J Clin Oncol.* (2016);34(27):3308-3314.. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.8013>
66. Arecco L, Blondeaux E, Bruzzone M, et al. Safety of fertility preservation techniques before and after anticancer treatments in young women with breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* (2022);37(5):954-968.. <https://doi.org/10.1093/humrep/deac035>
67. Liu Z, Sahli Z, Wang Y, et al. Young age at diagnosis is associated with worse prognosis in the Luminal A breast cancer subtype: a retrospective institutional cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* (2018);172(3):689-702.. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4950-4>
68. Shukair Y., MonteiroR.V. Prognostic factors and molecular subtypes in young women with breast cancer. *Mastology.* (2022);32:e20210065.. <https://doi.org/10.29289/2594539420210065>
69. Sharma JD, Khanna S, Ramchandani S, et al. Prevalence of Molecular Subtypes of Breast Carcinoma and Its Comparison between Two Different Age Groups: A Retrospective Study from a Tertiary Care Center of Northeast India. *South Asian J Cancer.* (2021);10(4):220-224. Published 2021 Dec 31.. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1731905>
70. Hashmi AA, Aijaz S, Khan SM, et al. Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients. *World J Surg Oncol.* (2018);16(1):1. Published 2018 Jan 2.. <https://doi.org/10.1186/s12957-017-1299-9>
71. Fredholm H, Magnusson K, Lindström LS, et al. Breast cancer in young women and prognosis: How important are proliferation markers?. *Eur J Cancer.* (2017);84:278-289.. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.07.044>
72. Vidal Tomas V., Sanchis S., Martinez M., et al. Global transcriptome deregulation of breast cancer in very young women samples. *Annals of oncol.* (2017);24:7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx361.024>

73. Parrinello S, Coppe JP, Krtolica A, et al. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci.* (2005);118(Pt 3):485-496.. <https://doi.org/10.1242/jcs.01635>
74. Lokate M, Stellato RK, Veldhuis WB, et al. Age-related changes in mammographic density and breast cancer risk. *Am J Epidemiol.* (2013);178(1):101-109.. <https://doi.org/10.1093/aje/kws446>
75. Checka CM, Chun JE, Schnabel FR, et al. The relationship of mammographic density and age: implications for breast cancer screening. *AJR Am J Roentgenol.* (2012);198(3):W292-W295.. <https://doi.org/10.2214/AJR.10.6049>
76. Zirbes A, Joseph J, Lopez JC, et al. Changes in Immune Cell Types with Age in Breast are Consistent with a Decline in Immune Surveillance and Increased Immunosuppression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* (2021);26(3):247-261.. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09495-2>
77. Zhao X, Qu J, Sun Y, et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in breast cancer: a meta-analysis of the literature. *Oncotarget.* (2017);8(18):30576-30586.. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15736>
78. Erbe R, Wang Z, Wu S, et al. Evaluating the impact of age on immune checkpoint therapy biomarkers [published correction appears in *Cell Rep.* (2021) Nov 16;37(7):110033]. *Cell Rep.* 2021;36(8):109599.. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109599>
79. Cirqueira MB, Mendonça CR, Noll M, et al. Prognostic Role of PD-L1 Expression in Invasive Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel).* (2021);13(23):6090. Published 2021 Dec 3.. <https://doi.org/10.3390/cancers13236090>
80. Qin T, Zeng YD, Qin G, et al. High PD-L1 expression was associated with poor prognosis in 870 Chinese patients with breast cancer. *Oncotarget.* (2015);6(32):33972-33981.. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5583>
81. Xiang X, Yu PC, Long D, et al. Prognostic value of PD -L1 expression in patients with primary solid tumors. *Oncotarget.* (2017);9(4):5058-5072. Published 2017 Dec 22.. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23580>

82. Demir H, Demirci A, Eren SK, et.al. New Prognostic Index in Young Breast Cancer Patients. *J Coll Physicians Surg Pak.* (2022);32(1):86-91.. <https://doi.org/10.29271/jcpsp.2022.01.86>

83. Fontvieille E, His M, Biessy C, et al. Inflammatory biomarkers and risk of breast cancer among young women in Latin America: a case-control study. *BMC Cancer.* (2022);22(1):877. Published 2022 Aug 11.. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09975-6>

84. Shvets YV, Lykhova OO, Chekhun VF. Human microbiota and breast cancer. *Exp Oncol.* (2022);44(2):95-106.. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17855>

85. Yang J, Tan Q, Fu Q, et al. Gastrointestinal microbiome and breast cancer: correlations, mechanisms and potential clinical implications. *Breast Cancer* (2016); 24: 1–9.. <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0734-z>

86. Banerjee S, Wei Z, Tan F, et al. Distinct microbiological signatures associated with triple negative breast cancer. *Sci Rep* (2015); 5: 15162.. <https://doi.org/10.1038/srep15162>

87. Goedert JJ, Jones G, Hua X, et al. Investigation of the association between the fecal microbiota and breast cancer in postmenopausal women: a population-based case-control pilot study. *J Natl Cancer Inst.* (2015);107(8):djv147. Published 2015 Jun 1.. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv147>

88. Aarnoutse R, Hillege LE, Ziemons J, et al. Intestinal Microbiota in Postmenopausal Breast Cancer Patients and Controls. *Cancers (Basel).* (2021);13(24):6200. Published 2021 Dec 9.. <https://doi.org/10.3390/cancers13246200>

89. Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–752. <https://doi.org/10.1038/35021093>

90. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Nat Med.* (2011);17(5):550–60.

91. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. (2011);144(5):646–74.
92. Zlotnik A, Yoshie O. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*. (2012);36(5):705–16.
93. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs. *Cell*.
94. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity*. (2007);27(2):190–202.
95. Ansel KM, Ngo VN, Hyman PL, Luther SA, Förster R, Sedgwick JD, et al. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. (2000);406(6793):309–14.
96. Gu-Trantien C, Loi S, Garaud S, Equeter C, Libin M, de Wind A, et al. CD4<sup>+</sup> follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. *J Clin Invest*. (2013);123(7):2873–92.
97. Dieu-Nosjean MC, Goc J, Giraldo NA, Sautès-Fridman C, Fridman WH. Tertiary lymphoid structures in cancer and beyond. *Nat Rev Immunol*. (2014);14(12):847–60.
98. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. (2015);33(9):983–91.
99. Song IH, Heo SH, Bang WS, Park HS, Park IA, Lee KS, et al. Predictive value of tertiary lymphoid structures assessed by CXCL13 expression for neoadjuvant chemotherapy response in breast cancer. *Oncotarget*. (2017);8(25):40710–20.
100. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD20<sup>+</sup> B cells and survival in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. (2014);106(11):dju308
101. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, Zhang S, Basar R, Thakur R, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*. (2020);577(7791):549–55.

102. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, Nevins JR, Potti A, Blackwell KL. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 10;26(20):3324-30. doi: 10.1200/JCO.2007.14.2471. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2011 Sep 20;29(27):3721. PMID: 18612148.

103. Chen X, He C, Han D, Zhou M, Wang Q, Tian J, et al. The predictive value of Ki-67 before neoadjuvant chemotherapy for breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* (2015);150(2):243–51.

104. Guo F, Wang Y, Liu J, Mok SC, Xue F, Zhang W. CXCL13/CXCR5 axis contributes to breast cancer progression through activation of ERK signaling pathway. *Oncol Lett.* (2018);15(5):6995–7002.

105. Schwartz LH, Litière S, de Vries E, et al. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer.* (2016);62:132-137.. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.081>

106. Ogston KN, Miller ID, Payne S, et al. A new histological grading system to assess response of breast cancers to primary chemotherapy: prognostic significance and survival. *Breast.* (2003);12(5):320-327.. [https://doi.org/10.1016/s0960-9776\(03\)00106-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9776(03)00106-1)

107. Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Fierro, F., Vanoye-Carlo, A., Rufino-González, Y., Sierra-Palacios, E., Castillo-Villanueva, A., Castillo-Rodríguez, R. A., Rodríguez-Bustamante, E., Arreguin-Espinosa, R., & Reyes-Vivas, H. ((2016)). Stem-Loop RT-qPCR as an Efficient Tool for the Detection and Quantification of Small RNAs in *Giardia lamblia*. *Genes*, 7(12), 131. <https://doi.org/10.3390/genes7120131>

108. Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. ((2013)). An improvement of the  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, bioinformatics and biomathematics*, 3(3), 71–85.

109. Chang, L., Zhou, G., Soufan, O., & Xia, J. ((2020)). miRNet 2.0: network-based visual analytics for miRNA functional analysis and systems biology. *Nucleic acids research*, 48(W1), W244–W251. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa467>

110. Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. ((2018)). DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic acids research*, 46(D1), D239–D245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>
111. Chandrashekar, D. S., Karthikeyan, S. K., Korla, P. K., Patel, H., Shovon, A. R., Athar, M., Netto, G. J., Qin, Z. S., Kumar, S., Manne, U., Creighton, C. J., & Varambally, S. ((2022)). UALCAN: An update to the integrated cancer data analysis platform. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 25, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.01.001>
112. Lánckzy, A., & Gyórfy, B. ((2021)). Web-Based Survival Analysis Tool Tailored for Medical Research (KMplot): Development and Implementation. *Journal of medical Internet research*, 23(7), e27633. <https://doi.org/10.2196/27633>
113. Gu-Trantien C, Migliori E, Buisseret L, et al. CXCL13-producing T follicular helper cells link immune suppression and adaptive immunity in breast cancer. *J Clin Invest* (2017); 127 (10): 3785–99. <https://doi.org/10.1172/jci.insight>.
114. Azim HA Jr, Partridge AH. Biology of breast cancer in young women. *Breast Cancer Res* (2014); 16 (4): 427. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0427-5>.
115. Prat A, Fan C, Fernández A, et al. Response and survival of breast cancer intrinsic subtypes following multi-agent neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* (2015);154 (2): 359–69. <https://doi.org/10.1007/s10549-015->
116. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy. *Ann Oncol* (2018); 29 (5): 1315–24. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.10.003>.
117. World Health Organization. "Breast Cancer." World Health Organization, 16 Apr. (2026), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>. Accessed [13.04.2026]
118. Fukumoto I, Kikkawa N, Matsushita R, et al. Tumor-suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218) concertedly suppressed

metastasis-promoting LOXL2 in head and neck squamous cell carcinoma. *J Hum Genet.* (2016);61(2):109–118. <https://doi.org/10.1038/jhg.2015.120>

119. Carvalho E, Canberk S, Schmitt F, Vale N. Molecular subtypes and mechanisms of breast cancer: precision medicine approaches for targeted therapies. *Cancers (Basel).* (2025);17(7):1102. <https://doi.org/10.3390/cancers17071102>

120. Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* (2012);486(7403):346-352.

121. Kingston B, Cutts RJ, Bye H, et al. Genomic profile of advanced breast cancer in circulating tumour DNA. *Nat Commun.* (2021);12:2423. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24791-519>.

122. Lian W, Fu F, Lin Y, et al. The impact of young age for prognosis by subtype in women with early breast cancer. *SciRep.* (2017);7:11625. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11819-420>.

123. McShane N, Zaborowski A, O'Reilly M, et al. Hormone receptor positive breast cancer in young women: a review. *J Surg Oncol.* (2025);131(4):580-586. <https://doi.org/10.1002/jso.27963>

124. Zhan MH, Man HT, Zhao XD, et al. Estrogen receptor-positive breast cancer molecular signatures and therapeutic potentials (Review). *Oncol Rep.* (2022);48(3):184. <https://doi.org/10.3892/or.2022.8345>.

125. Martyniuk O., Mushii A, Pavlova. Integrated Serum and Tumor Analysis of hsa-miR-26b-5p and hsa-miR-186-5p Reveals Their Prognostic and Predictive Significance in Breast Cancer. *Exp Oncol.* 2026;48(1):31-39. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2026.01.031>

126. Martyniuk O, Mushii O, Chekhun V. Role of miR-26b-5p and miR-186-5p in breast cancer patients of young age: clinical associations and relation to anthracycline response. *Exp Oncol.* 2025;47(4):459-466. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.04.459>

127. Martyniuk O, Smolanka I, Smolanka I, Med V, Tarasenko T, Chekhun V. Clinico-morphological features of the luminal b subtype of breast cancer in young

women. *Exp Oncol.* 2025; 47(2):245-250. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.02.245>

128. О.М. Мартинюк, В.Ф. Чехун. Вікові особливості експресії CXCL13 у тканині раку молочної залози та їх прогностичне і предиктивне значення. *Онкологія*, – 2025, 24(4): 232-239. <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.04.232>

129. Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна, С.А. Лялькин, Т.Є. Тарасенко, О.М. Мартинюк. Вплив поліморфізмів хемокінів на ефективність хіміотерапії у хворих на Her2/neu-негативний рак грудної залози // *Клінічна онкологія*, – 2023, 11(43-44):1-3. <https://doi.org/10.32471/clinicaloncology.2663-466X.43-3.28300>

130. Бондар М.В., Сивак Л.А., Тарасенко Т.Є., Мартинюк О.М., Лялькін С.А., Шудрак П.А. Особливості перебігу раку грудної залози з низьким рівнем експресії HER2/neu. *Клінічна онкологія*, – 2023, 13(50):1-3. <https://doi.org/10.32471/clinicaloncology.2663-466X.50-2.30634>.

131. O. Martyniuk, I. Smolanka (prof), I. Smolanka (junior), V. Chekhun (prof.), A. Lyashenko, T. Tarasenko, O. Lygyrda, P Shudrak, P156: The relevance of rising breast cancer incidence among young women under 45 in Ukraine: challenges in oncofertility. *The Breast.2025. Volume 80, Supplement of 19th St. Gallen International Breast Cancer Conference, 12th - 15<sup>th</sup> March, Vienna, 2025.*

132. O. Martyniuk, T. Tarasenko, L. Syvak, S. Lyalkin, M. Bondar. The impact of extraordinary situations such as war on tumor characteristics and time before the start of treatment in patients with non-metastatic breast cancer (BC), *The Breast, Volume 68, Supplement, 2023, Page S124, ISSN 0960-9776*, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00389-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00389-2).

133. Tetiana Tarasenko, Liubov Syvak, Olena Martyniuk, Maryna Bondar. Assessment of early progression risk for patient with ESR1 mutations and hormone receptor positive (HR+)/HER2-negative metastatic breast cancer (MBC), *The Breast, Volume 71, Supplement 1, 2023, Pages S52-S53, ISSN 0960-9776*, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00674-4).

134. Tarasenko T, Syvak L, Martyniuk O, Lyalkin S, Verovkina N, Kovalenko A. Characteristics of patients with metastatic luminal breast cancer (MLBC) and

ESR1 polymorphism, European Journal of Cancer, 175S71, [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(22\)01539-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(22)01539-8)

135. Bondar M, Tarasenko T, Martyniuk O, Syvak L. Prevalence and clinical features of HER2-low breast cancer among Ukrainian population. *The Breast*, 71S54, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00678-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00678-1)

136. Martyniuk O, Tarasenko T, Chekhun V, Smolanka I, Bondar M., Shudrak P. This study evaluates the impact of metabolic syndrome on pathological response in young patients ( $\leq 45$  years) with HER2-neu negative breast cancer after preoperative chemotherapy. The study includes the analysis of pathologic data to determine the relationship between metabolic status and treatment efficacy. *European Journal of Cancer*, 200. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2024.113701>

137. Методичні рекомендації «МікроРНК як прогностичні маркери раку молочної залози у хворих молодого віку» (В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, О.В. Кашуба, Т.В. Борікун, Т.В. Задворний, В.М. Базась, І.В. Шепеленко, О.М. Мартинюк, О.М. Мушій, А.О. Павлова, С.А. Лялькін, М.С. Кротевич – К., 2023. – 22 с.). [https://www.iepor.site/?page\\_id=250](https://www.iepor.site/?page_id=250)

## ДОДАТОК А



"Затверджую"

генеральний директор

КНП «Прикарпатський клінічний

онкологічний центр» ІФ ОР

Ігор ДМИТРЕНКО

"21" грудня 2023 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Назва впровадження:** Спосіб прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку
- Устнова-розробник, автори:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Чехун В.Ф., Борікун Т.В., Мушій О.М., Мартинюк О.М., Кашуба О.В. та ін.
- Джерело інформації:** Expression profile of tumor miRNAs in young patients with breast cancer. V. Chekhun, T. Borikun, O. Mushii, O. Martyniuk, E. Kashuba, V. Bazas, S. Hrybach, M. Krotevych, L. Sivak, S. Lyalkin, N. Lukianova. *Exp Oncol.* 2023; 45(4)
- Впроваджено в 2023 р. у КНП «Прикарпатський клінічний онкологічний центр Івано-Франківської обласної ради»
- Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023
- Загальна кількість спостережень 11
- Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

№№ з/п	Показники ефективності	За даними розробників	За даними організації, що впроваджує
1.	<b>Клінічні показники:</b> <i>Результати лікування:</i> - безпосередні (оцінка регресії новоутворень за шкалою ВООЗ),(%); - досягнення клінічної ремісії (тривалість безрецидивного періоду)	16 10	18 12
2.	<b>Соціальні:</b> - покращання якості життя хворого; - збільшення тривалості життя онкологічного хворого (виживаності), (місяців, років)	11 13	14 15

8. Зауваження, пропозиції немає

"21" грудня 2023 р.

Завідувач відділення

Світлана ГОРОШКО

завідувачка хіміотерапевтичним відділом

"Затверджую"  
В.о.Генеральний директор  
Кондратенко А.В.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Назва впровадження:** Спосіб прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку
- Устнова-розробник, автори:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Чехун В.Ф., Борікун Т.В., Мушій О.М., Мартинюк О.М., Кашуба О.В. та ін.
- Джерело інформації:** Expression profile of tumor miRNAs in young patients with breast cancer. V. Chekhun, T. Borikun, O. Mushii, O. Martyniuk, E. Kashuba, V. Bazas, S. Hrybach, M. Krotevych, L. Sivak, S. Lyalkin, N. Lukianova. Exp Oncol. 2023; 45(4)
- Впроваджено в 2023 р. у КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр»
- Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023
- Загальна кількість спостережень: 14
- Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

№№ з/п	Показники ефективності	За даними розробників	За даними організації, що впроваджує
1.	<b>Клінічні показники:</b> <i>Результати лікування:</i> - безпосередні (оцінка регресії новоутворень за шкалою ВООЗ),(%); - досягнення клінічної ремісії (тривалість безрецидивного періоду)	16  10	15  11
2.	<b>Соціальні:</b> - покращання якості життя хворого; - збільшення тривалості життя онкологічного хворого (виживаності), (місяців, років)	11  13	9  11

8. Зауваження, пропозиції немає

" " 2023 р.

Завідувач відділення САХІД

Клюсов А.О.

відповідальний за впровадження посада, підпис. П.І.Б.



"Затверджую"

Генеральний директор КНП КОР

Арешикович А.О.

" — " 2023 р.

22 ГРУ 2023

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва впровадження: Спосіб прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку
2. Устнова-розробник, автори: Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Чехун В.Ф., Борікун Т.В., Мушій О.М., Мартинюк О.М., Кашуба О.В. та ін.
3. Джерело інформації: Expression profile of tumor miRNAs in young patients with breast cancer. V. Chekhun, T. Borikun, O. Mushii, O. Martyniuk, E. Kashuba, V. Bazas, S. Hrybach, M. Krotevych, L. Sivak, S. Lyalkin, N. Lukianova. Exp Oncol. 2023; 45(4)
4. Впроваджено в 2023 р. у КНП КОР «Київський обласний онкологічний диспансер»
5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023
6. Загальна кількість спостережень 6
7. Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

№№ з/п	Показники ефективності	За даними розробників	За даними організації, що впроваджує
1.	<b>Клінічні показники:</b> <i>Результати лікування:</i> - безпосередні (оцінка регресії новоутворень за шкалою ВООЗ),(%); - досягнення клінічної ремісії (тривалість безрецидивного періоду)	16  10	17  10
2.	<b>Соціальні:</b> - покращання якості життя хворого; - збільшення тривалості життя онкологічного хворого (виживаності), (місяців, років)	11  13	11  13

8. Зауваження, пропозиції немає  
" 22 " 2023 р.

Завідувач 2 онкохірургічним відділенням КНП КОР "КООД"

Грибач С.М.

**ДОДАТОК Б****СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕЕРТАЦІЇ**

1. Martyniuk O., Mushii , A. Pavlova. Integrated Serum and Tumor Analysis of hsa-miR-26b-5p and hsa-miR- 186-5p Reveals Their Prognostic and Predictive Significance in Breast Cancer. *Exp Oncol.* 2026;48(1):31-39. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2026.01>.
2. Martyniuk O, Mushii O, Chekhun V. Role of miR-26b-5p and miR-186-5p in breast cancer patients of young age: clinical associations and relation to anthracycline response. *Exp Oncol.* 2025;47(4):459-466. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.04.459>
3. Martyniuk O, Smolanka I, Smolanka I, Med V, Tarasenko T, Chekhun V. Clinico-morphological features of the luminal b subtype of breast cancer in young women. *Exp Oncol.* 2025; 47(2):245-250. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.02.245>
4. О.М. Мартинюк, В.Ф. Чехун. Вікові особливості експресії CXCL13 у тканині раку молочної залози та їх прогностичне і предиктивне значення. *Онкологія*, – 2025, 24(4): 232-239. <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.04.232>
5. Л.А. Сивак, Н.О. Верьовкіна, С.А. Лялькин, Т.Є. Тарасенко, О.М. Мартинюк. Вплив поліморфізмів хемокінів на ефективність хіміотерапії у хворих на Her2/neu-негативний рак грудної залози // *Клінічна онкологія*, – 2023, 11(43-44):1-3. <https://doi.org/10.32471/clinicaloncology.2663-466X.43-3.28300>
6. Бондар М.В., Сивак Л.А., Тарасенко Т.Є., Мартинюк О.М., Лялькін С.А., Шудрак П.А. Особливості перебігу раку грудної залози з низьким рівнем експресії HER2/neu. *Клінічна онкологія*, – 2023, 13(50):1-3. <https://doi.org/10.32471/clinicaloncology.2663-466X.50-2.30634>
7. O. Martyniuk, I. Smolanka (prof), I. Smolanka (junior), V. Chekhun (prof.), A. Lyashenko, T. Tarasenko, O. Lygyrda, P Shudrak, P156: The relevance of rising breast cancer incidence among young women under 45 in Ukraine: challenges in oncofertility. *The Breast*.2025. Volume 80, Supplement of 19th St. Gallen International Breast Cancer Conference, 12th - 15<sup>th</sup> March, Vienna, 2025.

8. O. Martyniuk, T. Tarasenko, L. Syvak, S. Lyalkin, M. Bondar. The impact of extraordinary situations such as war on tumor characteristics and time before the start of treatment in patients with non-metastatic breast cancer (BC), *The Breast*, Volume 68, Supplement, 2023, Page S124, ISSN 0960-9776, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00389-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00389-2).

9. Tetiana Tarasenko, Liubov Syvak, Olena Martyniuk, Maryna Bondar. Assessment of early progression risk for patient with ESR1 mutations and hormone receptor positive (HR+)/HER2-negative metastatic breast cancer (MBC), *The Breast*, Volume 71, Supplement 1, 2023, Pages S52-S53, ISSN 0960-9776, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00674-4](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00674-4).

10. Tarasenko T, Syvak L, Martyniuk O, Lyalkin S, Verovkina N, Kovalenko A. Characteristics of patients with metastatic luminal breast cancer (MLBC) and ESR1 polymorphism, *European Journal of Cancer*, 175S71, [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(22\)01539-8](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(22)01539-8)

11. Bondar M, Tarasenko T, Martyniuk O, Syvak L. Prevalence and clinical features of HER2-low breast cancer among Ukrainian population. *The Breast*, 71S54, [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(23\)00678-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(23)00678-1)

12. Martyniuk O, Tarasenko T, Chekhun V, Smolanka I, Bondar M., Shudrak P. This study evaluates the impact of metabolic syndrome on pathological response in young patients ( $\leq 45$  years) with HER2-neu negative breast cancer after preoperative chemotherapy. The study includes the analysis of pathologic data to determine the relationship between metabolic status and treatment efficacy. *European Journal of Cancer*, 200. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2024.113701>

13. Методичні рекомендації «МікроРНК як прогностичні маркери раку молочної залози у хворих молодого віку» (В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, О.В. Кашуба, Т.В. Борікун, Т.В. Задворний, В.М. Базась, І.В. Шепеленко, О.М. Мартинюк, О.М. Мушій, А.О. Павлова, С.А. Лялькін, М.С. Кротевич – К., 2023. – 22 с.). [https://www.iepor.site/?page\\_id=250](https://www.iepor.site/?page_id=250)

### **Відомості про апробацію результатів дисертації**

1. European Breast Cancer Conference EBCC-13, 16-18 November, Barselona, 2022) – постерна доповідь.
  2. 18th St. Gallen International Breast Cancer Conference (15th - 18th March, Vienna, 2023) - постерна доповідь.
  3. «UPTODATE 4.0 +МОЛЕКУЛЯРНІ ЗУСТРІЧІ» ( 23-24 листопада, Київ, 2023) - усна доповідь.
  4. Masterclass in Clinical Oncology - Summer edition Varese (, 23-27, June 2023, Italy) - усна доповідь.
  5. 14th European Breast Cancer Conference (EBCC-14) (20-22 March, Milan, 2024) - усна доповідь.
  6. 19th St. Gallen International Breast Cancer Conference (12th - 15th March, Vienna, 2025) - постерна доповідь.
- .