

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

МУШІЙ ОЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ

УДК 618.19-006.6-091.8:577.112:577.21

ДИСЕРТАЦІЯ

**ІНТЕГРАТИВНИЙ АНАЛІЗ АРХІТЕКТОНІКИ КОЛАГЕНОВОЇ
СТРОМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИХ МАРКЕРІВ ЇЇ
РЕМОДЕЛЮВАННЯ ПРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

091 - Біологія

09 – Біологія

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. Мушій

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

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Мушій О. М. Інтегративний аналіз архітектоніки колагенової стромы та молекулярно-біологічних маркерів її ремоделювання при раку молочної залози. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії в галузі знань 09 — Біологія за спеціальністю 091 — Біологія. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького Національної академії наук України. Київ, 2026.

Рак молочної залози (РМЗ) залишається одним із найпоширеніших злоякісних новоутворень у жінок і характеризується значною біологічною та клінічною гетерогенністю. Подальше підвищення ефективності його діагностики та прогнозування потребує пошуку об'єктивних кількісних ознак, які відображають не лише властивості пухлинних клітин, а й стан їхнього мікрооточення. Важливим компонентом пухлинного мікрооточення є строма, біохімічні та біофізичні характеристики якої впливають на адгезію, проліферацію, міграцію і поляризацію клітин, тканинний морфогенез, інвазію та метастазування.

Основним фібрилярним компонентом стромы є колаген. Зміни його кількісного представництва, просторової геометрії та взаємного розташування волокон формують специфічну архітектоніку пухлинного осередку і можуть сприяти прогресуванню злоякісного процесу. Функціональний стан колагенового каркасу визначається узгодженою активністю молекул, залучених до його синтезу, протеолітичної деградації, інгібування протеолізу та утворення поперечних зшивок. Водночас недостатньо з'ясованими залишаються взаємозв'язки між просторовою організацією колагенових волокон, експресією білків ремоделювання позаклітинного матриксу та регуляторними мікроРНК на різних етапах

прогресування РМЗ. Використання цих характеристик у клінічній практиці також обмежується суб'єктивністю традиційного візуального оцінювання гістологічних препаратів. Тому актуальним є поєднання молекулярно-біологічних методів із цифровою морфометрією та автоматизованим аналізом зображень для створення відтворюваних математичних критеріїв дезорганізації колагенового матриксу.

Дисертаційну роботу присвячено ідентифікації особливостей просторової організації та кількісних характеристик колагенової матриці, асоційованих з агресивністю перебігу РМЗ. Об'єктом дослідження був рак молочної залози, а предметом — колагеновий каркас тканини РМЗ, його кількісні параметри та їхні взаємозв'язки з експресією MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX та мікроРНК, залучених до регуляції ремоделювання колагенової стромы.

У роботі застосовано загально-клінічні, гістоморфологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, молекулярно-генетичні, біоінформатичні, цифрові морфометричні, статистичні та математичні методи. Для специфічної візуалізації колагенового матриксу використовували забарвлення за Маллорі. Цифрову сегментацію та кількісне оцінювання довжини, ширини, прямолінійності, кута орієнтації і щільності колагенових волокон, а також співвідношення пухлина—строма (tumour—stroma ratio, TSR) здійснювали за допомогою програм CurveAlign та ImageJ. Експресію білків ремоделювання стромального мікрооточення MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX досліджували імуногістохімічним методом, а рівні відібраних мікроРНК — методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією. Для аналізу результатів використовували варіаційну статистику, кореляційний аналіз, а також лінійні й логістичні регресійні моделі.

Уперше розроблено та апробовано алгоритм верифікації параметрів дезорганізації колагенового матриксу у тканині РМЗ, який поєднує

гістохімічне забарвлення, цифрову сегментацію волокон і подальший морфометричний аналіз. Апробацію алгоритму проведено на 120 зразках тканини РМЗ та 30 зразках тканини фіброаденом. Загалом проаналізовано близько 1,4 млн колагенових волокон, що дозволило кількісно охарактеризувати архітекtonіку стромального компонента доброякісних і злоякісних новоутворень молочної залози та мінімізувати суб'єктивність морфологічної оцінки.

Встановлено, що тканина РМЗ має специфічний морфометричний профіль організації колагенового матриксу. Порівняно з тканиною доброякісних новоутворень молочної залози вона характеризувалася зменшенням довжини ($p < 0,001$) і ширини ($p < 0,001$) колагенових волокон на тлі підвищення їхньої прямолінійності ($p < 0,001$) та зміни просторової орієнтації ($p < 0,05$). Отримані дані свідчать, що малігнізація супроводжується не лише кількісною перебудовою строми, а й формуванням відмінного топологічного профілю волокнистого матриксу.

Доведено зв'язок морфометричних характеристик колагенової строми зі ступенем поширеності пухлинного процесу. Збільшення розміру РМЗ асоціювалося зі зменшенням довжини ($p = 0,0006$) і ширини ($p < 0,0001$) колагенових волокон та підвищенням їхньої щільності ($p = 0,0027$). Наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах супроводжувалася зменшенням довжини і ширини волокон, збільшенням їхньої прямолінійності та щільності, а також підвищенням показника TSR (для всіх зазначених змін $p < 0,0001$). Найтісніші кореляційні зв'язки з клінічними характеристиками РМЗ встановлено для ширини колагенових волокон: із категорією Т коефіцієнт кореляції становив $r = -0,751$, а з категорією N — $r = -0,711$. Щільність волокон прямо корелювала з категорією N ($r = 0,790$).

На основі отриманих результатів побудовано багатофакторні регресійні моделі. Встановлено, що ширина, довжина та щільність колагенових волокон є незалежними предикторами розміру пухлинного

вогнища; коефіцієнт детермінації відповідної моделі становив $R^2=0,679$. Ширина і щільність волокон разом із показником TSR були незалежними предикторами метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів; модель пояснювала 77,2% варіабельності досліджуваної ознаки ($R^2=0,772$). Це підтверджує можливість кількісного використання архітекtonіки колагенової строми для комплексного оцінювання агресивності РМЗ.

Ідентифіковано профіль експресії білків ремоделювання стромального мікрооточення та встановлено його зв'язок із просторовою організацією колагенової матриці. Експресія MMP1 прямо корелювала з прямолінійністю колагенових волокон ($r=0,273$), тоді як експресія MMP8 була обернено пов'язана з їхньою шириною, довжиною та прямолінійністю (r від $-0,267$ до $-0,303$). Рівень TIMP3 обернено корелював із шириною, прямолінійністю та щільністю волокон і прямо — з кутом їхньої орієнтації (r від $-0,462$ до $0,443$). Для LOX встановлено пряму кореляцію з кутом орієнтації колагенових волокон ($r=0,301$).

Показано, що низькодиференційований РМЗ характеризувався підвищенням експресії MMP1 на 59,2%, MMP8 — на 96,6% та LOX — у 2,05 рази ($p<0,05$). Збільшення розміру пухлини та наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів супроводжувалося підвищенням рівня LOX відповідно на 74,2 і 57,8%, тоді як у пухлинах категорії T2 експресія TIMP3 знижувалася на 65,6% ($p<0,05$). Отже, поєднане визначення MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX із морфометричними параметрами колагенових волокон цілісно відображає структурні та молекулярні прояви ремоделювання пухлинної строми при прогресуванні РМЗ.

Уперше встановлено асоціацію експресії мікроРНК, залучених до регуляції генів ремоделювання позаклітинного матриксу, з клініко-патологічними характеристиками РМЗ. Підвищена експресія miR-26b-5p була пов'язана з відсутністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (N0) та люмінальним В молекулярним підтипом ($p<0,05$).

Високий рівень miR-100-5p асоціювався з меншим розміром первинної пухлини та початковою стадією пухлинного процесу ($p < 0,05$), а підвищена експресія miR-142-3p — з HER2/neu -позитивним молекулярним підтипом ($p < 0,05$). Ці результати розширюють уявлення про регуляторні механізми ремоделювання пухлинного мікрооточення та обґрунтовують подальше дослідження зазначених мікроРНК як потенційних маркерів перебігу РМЗ.

Практичне значення роботи полягає у розробці відтворюваного алгоритму комп'ютерної сегментації та морфометричного оцінювання колагенового матриксу, який у перспективі може бути інтегрований у роботу патологоанатомічних лабораторій та онкологічних центрів як додатковий інструмент цифрової патології. Ширина і щільність колагенових волокон та показник TSR можуть розглядатися як перспективні кількісні критерії оцінювання ризику регіонарного метастазування. Встановлені зв'язки експресії MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX із клініко-патологічними характеристиками РМЗ та архітектонікою колагенової матриці визначають перспективність їх комплексного використання для стратифікації хворих за ризиком прогресування пухлинного процесу. У дисертаційній роботі теоретично узагальнено й експериментально обґрунтовано морфометричні та молекулярно-біологічні критерії дезорганізації колагенового каркасу як інформативні характеристики агресивності перебігу РМЗ. Сформовано перелік перспективних прогностичних ознак, що охоплює параметри просторової організації волокнистого матриксу та показники експресії білків, залучених до його перебудови. Результати дослідження і створені регресійні моделі є підґрунтям для подальшої розробки та валідації автоматизованих систем підтримки прийняття клінічних рішень з елементами штучного інтелекту в онкоморфології.

За матеріалами дисертації опубліковано 18 наукових праць, зокрема 9 статей і 8 тез доповідей на наукових конференціях.

Ключові слова: рак молочної залози, пухлинне мікрооточення, колагенова строма, колагеновий матрикс, архітектоніка, морфометрія, цифрова патологія, матриксні металопротейнази, TIMP3, LOX, мікроРНК, метастазування, регресійні моделі.

SUMMARY

Mushii O. M. Integrative analysis of the architecture of the collagenous stroma and molecular-biological markers of its remodeling in breast cancer.
— Qualifying scientific work presented as a manuscript.

Dissertation submitted for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 — Biology, speciality 091 — Biology. R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the National Academy of Sciences of Ukraine. Kyiv, 2026.

Breast cancer (BC) remains one of the most common malignancies in women and is characterised by considerable biological and clinical heterogeneity. Further improvements in its diagnosis and prognostication require objective quantitative features that reflect not only the properties of tumour cells but also the state of their microenvironment. The tumour stroma is an important component of this microenvironment, and its biochemical and biophysical characteristics influence cell adhesion, proliferation, migration and polarisation, tissue morphogenesis, invasion, and metastatic dissemination.

Collagen is the principal fibrillar component of the stroma. Alterations in its abundance, spatial geometry, and arrangement of fibres create a specific architecture within the tumour focus and may facilitate malignant progression. The functional state of the collagen framework is determined by the coordinated activity of molecules involved in collagen synthesis, proteolytic degradation, inhibition of proteolysis, and intermolecular cross-linking. However, the relationships between the spatial organisation of collagen fibres, the expression of extracellular matrix remodelling proteins, and regulatory microRNAs at different stages of BC progression remain insufficiently understood. The clinical use of these characteristics is also constrained by the subjectivity of conventional visual assessment of histological sections. Integrating molecular biological methods with

digital morphometry and automated image analysis is therefore necessary to establish reproducible mathematical criteria for collagen matrix disorganisation.

The dissertation aimed to identify the spatial organisation features and quantitative characteristics of the collagen matrix associated with aggressive breast cancer behaviour. The object of the study was breast cancer, whereas the subject comprised the collagen framework of BC tissue, its quantitative parameters, and their associations with the expression of MMP1, MMP8, TIMP3, LOX, and microRNAs involved in the regulation of collagen stromal remodelling.

The study employed general clinical, histomorphological, histochemical, immunohistochemical, molecular genetic, bioinformatic, digital morphometric, statistical, and mathematical methods. Mallory staining was used for specific visualisation of the collagen matrix. Digital segmentation and quantitative assessment of collagen fibre length, width, straightness, orientation angle, and density, as well as the tumour–stroma ratio (TSR), were performed using CurveAlign and ImageJ. The expression of the stromal remodelling proteins MMP1, MMP8, TIMP3, and LOX was evaluated immunohistochemically, while selected microRNAs were quantified by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction. The results were analysed using descriptive and inferential statistics, correlation analysis, and linear and logistic regression modelling.

For the first time, an algorithm for verifying collagen matrix disorganisation in BC tissue was developed and tested by combining histochemical staining, digital fibre segmentation, and subsequent morphometric analysis. The algorithm was evaluated using 120 BC tissue samples and 30 fibroadenoma tissue samples. Approximately 1.4 million collagen fibres were analysed, enabling quantitative characterisation of stromal architecture in benign and malignant breast neoplasms while reducing the subjectivity of morphological assessment.

BC tissue was shown to possess a specific morphometric profile of collagen matrix disorganisation. Compared with benign breast neoplasms, BC tissue was characterised by reduced collagen fibre length ($p<0.001$) and width ($p<0.001$), together with increased fibre straightness ($p<0.001$) and altered spatial orientation ($p<0.05$). These findings demonstrate that malignant transformation is accompanied not only by quantitative stromal remodelling but also by the formation of a distinct topological profile of the fibrous matrix.

The morphometric characteristics of the collagen stroma were associated with the extent of tumour progression. Increasing tumour size was associated with reduced collagen fibre length ($p=0.0006$) and width ($p<0.0001$) and with increased fibre density ($p=0.0027$). Regional lymph node involvement was accompanied by reduced fibre length and width, increased straightness and density, and a higher TSR ($p<0.0001$ for all listed changes). The strongest correlations with the clinical characteristics of BC were identified for collagen fibre width: the correlation coefficients were $r=-0.751$ for the T category and $r=-0.711$ for the N category. Fibre density was positively correlated with the N category ($r=0.790$).

Multivariable regression models were constructed from the obtained data. Collagen fibre width, length, and density were identified as independent predictors of primary tumour size, with the corresponding model achieving a coefficient of determination of $R^2=0.679$. Fibre width and density together with TSR were independent predictors of regional lymph node involvement; this model explained 77.2% of the variability in the outcome ($R^2=0.772$). These findings support the quantitative use of collagen stromal architecture for the integrated assessment of aggressive BC behaviour.

The expression profile of stromal remodelling proteins and its relationship with the spatial organisation of the collagen matrix were determined. MMP1 expression was positively correlated with collagen fibre straightness ($r=0.273$), whereas MMP8 expression was inversely associated with fibre width, length, and straightness (r ranging from -0.267 to -0.303). TIMP3 expression was inversely

correlated with fibre width, straightness, and density and positively correlated with fibre orientation angle (r ranging from -0.462 to 0.443). LOX expression was positively correlated with collagen fibre orientation angle ($r=0.301$).

Poorly differentiated tumours were characterised by increases in MMP1 expression of 59.2%, MMP8 expression of 96.6%, and LOX expression of 2.05-fold ($p<0.05$). Increasing tumour size and regional lymph node involvement were accompanied by increases in LOX expression of 74.2% and 57.8%, respectively, whereas TIMP3 expression was reduced by 65.6% in T2 tumours ($p<0.05$). Thus, the combined assessment of MMP1, MMP8, TIMP3, and LOX with collagen fibre morphometry comprehensively reflects the structural and molecular manifestations of tumour stromal remodelling during BC progression.

For the first time, associations were established between the expression of microRNAs involved in regulating extracellular matrix remodelling genes and the clinicopathological characteristics of BC. Higher miR-26b-5p expression was associated with the absence of regional lymph node involvement (N0) and with the luminal B molecular subtype ($p<0.05$). Higher miR-100-5p expression was associated with a smaller primary tumour and a lower disease stage ($p<0.05$), while increased miR-142-3p expression was associated with the HER2-positive molecular subtype ($p<0.05$). These findings extend current understanding of the regulatory mechanisms underlying tumour microenvironment remodelling and support further investigation of these microRNAs as potential markers of the clinical course of BC.

The practical significance of the dissertation lies in the development of a reproducible algorithm for computer-based segmentation and morphometric assessment of the collagen matrix. Following further validation, the algorithm may be integrated into pathology laboratories and oncology centres as an additional digital pathology tool. Collagen fibre width and density and TSR may be considered promising quantitative criteria for assessing the risk of regional lymph node involvement. The identified associations of MMP1, MMP8, TIMP3, and

LOX expression with the clinicopathological characteristics of BC and collagen matrix architecture support their potential combined use for stratifying patients according to the risk of tumour progression.

The dissertation provides a theoretical synthesis and experimental substantiation of morphometric and molecular biological criteria of collagen framework disorganisation as informative characteristics of aggressive BC behaviour. A set of promising prognostic features was established, encompassing the spatial organisation of the fibrous matrix and the expression of proteins involved in its remodelling. The findings and regression models provide a foundation for the subsequent development and validation of automated clinical decision support systems incorporating artificial intelligence in oncopathology.

Eighteen scientific publications were produced from the dissertation research, including nine journal articles and eight conference abstracts.

Keywords: breast cancer, tumour microenvironment, collagen stroma, collagen matrix, architecture, morphometry, digital pathology, matrix metalloproteinases, TIMP3, LOX, microRNA, metastasis, regression models.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Lukianova, N., Zadvornyi, T., Mushii, O., Pyatchanina, T., & Chekhun, V. (2022). Evaluation of diagnostic algorithm based on collagen organization parameters for breast tumors. *Experimental oncology*, 44(4), 281–286. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-4.19137>. (Особистий внесок здобувача: робота із гістологічним матеріалом та клінічними даними, лабораторні дослідження, розробка методологічних підходів, обробка отриманих результатів, написання тексту статті).
2. Chekhun, V., Martynyuk, O., Lukianova, Y., Mushii, O., Zadvornyi, T., & Lukianova, N. (2023). Features of breast cancer in patients of young age: search for diagnosis optimization and personalized treatment. *Experimental oncology*, 45(2), 139–150. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.02.139>. (Особистий внесок здобувача: робота із літературними джерелами, редакція тексту статті).
3. Chekhun, V., Mushii, O., Zadvornyi, T., Borikun, T., Martyniuk, O., Kashuba, E., Kryzhanivska, A., Andriiv, A., Diakiv, I., & Lukianova, N. (2023). Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. *Experimental oncology*, 45(3), 351–363. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.03.351> (Особистий внесок здобувача: лабораторні дослідження, статистична обробка отриманих результатів, написання тексту статті).
4. Lukianova, N., Mushii, O., Zadvornyi, T., & Chekhun, V. (2024). Development of an algorithm for biomedical image analysis of the spatial organization of collagen in breast cancer tissue of patients with different clinical status. *FEBS open bio*, 14(4), 675–686. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13773> (Особистий внесок здобувача: робота із гістологічним матеріалом та

клінічними даними, лабораторні дослідження, розробка методологічних підходів, обробка отриманих результатів, написання тексту статті).

5. Lukianova, N., Mushii, O., Zadvornyi, T., Borikun, T., Pavlova, A., Kunska, L., & Chekhun, V. (2024). Features of collagenase gene expression in breast cancer tissue: an open databases analysis. *Oncology*, 26(1), 22-8. <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.01.022> (Особистий внесок здобувача: робота із літературними джерелами, біоінформатичний аналіз, узагальнення отриманих результатів, написання тексту статті).

6. Задворний, Т. В., Бурда, Т. С., Мушій, О. М., Базась, В. М., Павлова, А. О., Шепеленко, І. В., & Лук'янова, Н. Ю. (2025). Роль стресорних факторів у модуляції експресії та функціональної активності матриксних металопротеїназ. *Oncology*, 27(2), 111-118. <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.02> (Особистий внесок здобувача: робота із літературними джерелами, редакція тексту статті).

7. Martyniuk, O., Mushii, O., & Pavlova, A. (2026). Integrated analysis of hsa-miR-26b-5p and hsa-miR-186-5p in blood serum and tumor tissue reveals their prognostic and predictive significance in breast cancer. *Experimental oncology*, 48(1), 31-39. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2026.01.031> (Особистий внесок здобувача: лабораторні дослідження, статистична обробка отриманих результатів, написання тексту статті)

8. Chekhun, V., Lukianova, Y., Mushii, O., Zadvornyi, T., Pavlova, A., Burda, T., & Lukianova, N. (2026). Breast cancer microenvironment composition associated with high PD-L1 expression. *BMC cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-026-15542-0> (Особистий внесок здобувача: лабораторні дослідження, статистична обробка отриманих результатів, написання тексту статті)

9. Mushii O.M., Burda T.S., Shevchuk A.O., Kokoilo M.V., Levenets A.Yu., Zadvornyi T.V. Collagen matrix remodelling as a factor tumour progression

aggressiveness: the role of proteases and cross-linking enzymes. Онкологія. 2026. 28, No 2. С. 97–111. <https://doi.org/10.15407/oncology.2026.02.097> (Особистий внесок здобувача: робота із літературними джерелами, біоінформатичний аналіз, узагальнення отриманих результатів, написання тексту статті).

10. Oleksandr Mushii, Taras Zadvornyi, Nataliia Lukianova, Vasyl Chekhun. Collagen extracellular matrix quantitative parameters in benign and malignant breast cancer neoplasms. BSI Science and Society Conference 2023. 20230448, February 25-26, 2023, University of Toronto.

11. Oleksandr Mushii, Taras Zadvornyi, Tetiana Borikun, Olena Martyniuk, Yelyzaveta Lukianova, Vasyl Chekhun. Prognostic and predictive value of COL1A1 in breast cancer patients of young age. 1st International Conference for Doctoral Students and Young Scientists, "OncoPhD", Abstr, 2024, 60 p. Lublin, October 20-22, 2023

12. Oleksandr Mushii, Taras Zadvornyi, Nataliia Lukianova, Vasyl Chekhun. Correlation between collagen fiber morphometric parameters and aggressiveness of breast cancer. International Scientific Conferences on Medicine & Public Health, Research Week 2023, Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia. Medicina, Volume 59, Supplement 2, p. 152.

13. Oleksandr Mushii, Olena Martyniuk, Taras Zadvornyi, Tetiana Borikun, Anastasiia Koziaruk, Yelyzaveta Lukianova, Vasyl Chekhun. Prognostic Role of COL1A1 in Young Age Breast Cancer Patients. Науково-практична конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку», 8-10 листопада 2023, Чернівці. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції, с. 28-31.

14. Mushii O., Lukianova N., Zadvornyi T., Pavlova A., Martyniuk O., Chekhun V. Differential expression of matrix metalloproteinases in benign and malignant mammary gland tissue. XX міжнародна наукова конференція

студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології», 18-20 квітня 2024, Львів.
Abstract book, p.p. 287-288

15. Shevchuk A., Mushii O., Zadvornyi T. Study of collagenase gene expression profiles in breast cancer: bioinformatic open data analysis. XXI International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: advancements in life sciences», Kyiv, 24-26 April, 2024. Book of abstracts, p.p. 63-64.

16. Oleksandr Mushii, Taras Zadvornyi, Anastasiia Shevchuk, Vasyl Chekhun. The relationship between collagen matrix remodeling proteins and the clinical status of breast cancer patients. International Research Conference On Medical And Health Care Sciences «Knowledge for Use in practice», 26-28 March 2025, Riga, Latvia. Book of abstracts, p. 225

17. Mushii O., Zadvornyi T., Burda T., Shevchuk A., Pavlova A. MicroRNA-Based Multiple Logistic Regression Models for Predicting Molecular Subtypes of Breast Cancer. 11th BSI Science and Society Conference 2026. 2026109

18. Методичні рекомендації «Колагени як предиктивні маркери ефективності хіміотерапевтичного лікування хворих на рак молочної залози молодого віку» (В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, Є.В. Кашуба, Т.В. Борікун, Т.В. Задворний, В.М. Базась, А.О. Павлова, О.М. Мушій, І.В. Шепеленко, І.М. Тодор, А.Є. Крижанівська, І.Б. Дяків, А.В. Андріїв//Київ, 2023. – 21 с.)
<https://www.iepor.site/wp-content/uploads/2024/04/2.pdf>

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1. Пухлинна строма, як драйвер розвитку та прогресії злоякісних новоутворень	29
1.2. Білки ремоделювання позаклітинного матриксу: механізми реорганізації пухлинної строми та їх зв'язок із перебігом злоякісних новоутворень	34
1.3. Колагеновий матрикс як детермінанта злоякісності та терапевтичної резистентності новоутворень	41
1.4. Регуляція експресії генів колагенового матриксу: генетичні та епігенетичні механізми формування архітекtonіки пухлинної строми	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	55
2.1. Клініко-патологічні характеристики хворих на рак молочної залози	55
2.2. Алгоритм оцінки морфометричних параметрів просторової організації колагенової матриці	60
2.3. Біоінформатичний аналіз	61
2.4. Імуногістохімічне дослідження білків ремоделювання позаклітинного матриксу	63
2.5. Визначення експресії мікроРНК, та мРНК методом RT-qPCR	66
2.6. Методи статистичного аналізу даних	68

РОЗДІЛ 3. МОРФОМЕТРИЧНІ ОЗНАКИ ДЕЗОРГАНІЗАЦІЇ КОЛАГЕНУ ЯК ІНФОРМАТИВНІ АТРИБУТИ, АСОЦІЙОВАНІ З ПЕРЕБІГОМ РМЗ

3.1. Розробка алгоритму оцінки просторової організації колагенової матриці у тканині раку молочної залози	70
3.2. Морфометричний фенотип колагенової строми залежно від клініко-патологічних характеристик РМЗ	81
3.3. Архітектоніка колагенової строми РМЗ із різним метастатичним статусом	87

РОЗДІЛ 4. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПРОФІЛЮ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ КОЛАГЕНІВ ТА БІЛКІВ РЕМОДЕЛЮВАННЯ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ У ТКАНІНІ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

4.1. <i>In silico</i> аналіз клінічного значення показників експресії білкових компонентів колагенової строми РМЗ	95
4.1.1. Біоінформатична оцінка діагностичного та прогностичного потенціалу експресії колагенів фібрилярного типу на рівні білка у тканині новоутворень молочної залози	95
4.1.2. Визначення прогностичного значення білків ремоделювання строми у хворих на РМЗ з використанням відкритих баз даних.	98
4.2. Зв'язок показників експресії генів фібрилярних колагенів з клінічним статусом хворих на РМЗ <i>ex vivo</i> на клінічному матеріалі	104
4.2.1. Оцінка прогностичного та предиктивного значення COL1A1 у тканині хворих на рак молочної залози різних вікових груп.	109
4.3. Профіль експресії MMP-1 та MMP-8 у тканині РМЗ хворих з різним клінічним статусом	117
4.4. Зв'язок експресії TIMP-3 від клініко-патологічних та молекулярно-біологічних особливостей РМЗ.	120
4.5. Клінічне значення експресії LOX у тканині РМЗ різного ступеня злоякісності.	122

4.6. Молекулярний профіль колагенової строми пухлин із різним метастатичним статусом	125
РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ ЕПІГЕНЕТИЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ГЕНІВ КОЛАГЕНІВ ТА БІЛКІВ РЕМОДЕЛЮВАННЯ СТРОМАЛЬНОГО КОМПОНЕНТУ ПУХЛИННОГО МІКРООТОЧЕННЯ У ТКАНИНІ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ	130
5.1. Ідентифікація потенційних мікроРНК-регуляторів пухлинного мікросередовища в системі <i>in silico</i>	130
5.2. Оцінка клінічного значення експресії ідентифікованих мікроРНК у хворих на рак молочної залози в системі <i>ex vivo</i>	140
РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	144
6.1. Методичні засади кількісного аналізу колагенової строми РМЗ	145
6.2. Просторова реорганізація колагенового матриксу як ознака прогресування РМЗ	146
6.3. Молекулярна регуляція архітекtonіки колагену за участі білків ремоделювання пухлинної строми	150
6.4. Зв'язок експресії COL1A1, COL3A1 і мікроРНК з морфометричним фенотипом строми РМЗ	153
6.5. Інтегрована модель молекулярно-морфологічної перебудови колагенової строми РМЗ	156
6.6. Прогностичні моделі та перспективи клінічного використання морфометричних параметрів	158
ВИСНОВКИ	165
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	168
ДОДАТОК А	186
ДОДАТОК Б	198

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

PM3	–	рак молочної залози
MMP	–	матриксні металопротеїнази
TIMP	–	тканинні інгібітори матриксних металопротеїназ
LOX	–	лізил оксидаза
ЕМП	–	епітеліально-мехенхімальний перехід
PLOD	–	проколаген-лізин, 2-оксоглутарат 5- диоксигеназа
FACIT	–	Фібрилоасоційовані колагени з переривчастими потрійними спіралями
COL1A1	–	альфа-1 ланцюг колагену I типу
TGF- β 1	–	Трансформуючий фактор росту бета 1
COL3A1	–	альфа-1 ланцюг колагену III типу
SHG-мікроскопія	–	мікроскопія генерації другої гармоніки
TSR	–	пухлинно-стромальне співвідношення
ПКМ	–	позаклітинний матрикс

ВСТУП

Актуальність теми.

Високі показники захворюваності та смертності від раку молочної залози (РМЗ) на сьогоднішній день свідчать про важливість розробки нових та оптимізацію і автоматизацію уже існуючих підходів задля покращення прогнозування перебігу пухлинного процесу. Створення уніфікованого алгоритму із використанням баз даних та залученням елементів штучного інтелекту дасть можливість підвищити ефективність показників діагностики та лікування РМЗ.

Численними дослідженнями встановлено, що важлива роль у розвитку та прогресії РМЗ належить стромі як елементу пухлини. Остаточного доведено, що стромальний компонент пухлинного вогнища є складною та динамічною структурою, хімічні та біофізичні властивості якої впливають на клітинну адгезію, проліферацію, міграцію, морфологію, регулюють тканинний морфогенез та об'єм рідини в тканинах. Незважаючи на продемонстровану роль стромального мікрооточення при пухлинному рості, молекулярно-біологічні параметри дезорганізації колагену, асоційовані зі ступенем злоякісності РМЗ, остаточно не з'ясовано.

Основним фібрилярним компонентом строми є колаген, який становить до 30% від загальної маси білка в організмі людини. Як показали результати досліджень, зміни морфології, репрезентації та організації колагенових волокон сприяють формуванню унікального мікрооточення, яке стимулює пухлинну прогресію, насамперед через вплив на клітинну міграцію та поляризацію.

Згідно з даними літератури, функціональний стан колагенового каркасу залежить від активності матриксних металопротеїназ (ММР), ключовими регуляторами функціональної активності яких є їх тканинні інгібітори

(TIMP). Ці протеїни безпосередньо відповідають за модифікацію колагенового каркасу шляхом розрізання потрійної спіралі колагенової молекули. Доведено зв'язок високого рівня експресії MMP на рівні білка із несприятливим перебігом пухлинного процесу та низькими показниками безрецидивної виживаності хворих на РМЗ.

Антагоністом ензимів родини матриксних металопротеїназ є лізілоксидаза (LOX). Продукт гена LOX відповідає за утворення поперечних зшивок між окремими колагеновими фібрилами у складі волокна. Таким чином, LOX бере участь в утворенні нових колагенових волокон та інтеркаляції їх до складу єдиної системи мікрооточення як в нормі, так і при злоякісному рості.

Незважаючи на накопичений масив даних про участь окремих ланок позаклітинного матриксу в онкогенезі, досі відсутнє цілісне розуміння того, як саме просторова геометрія колагенових волокон пов'язана з експресією білків їх ремоделювання та регуляторними мікроРНК на різних етапах пухлинної прогресії. Крім того, суб'єктивізм традиційної візуальної оцінки гістологічних препаратів обмежує використання стромальних маркерів у клінічній практиці. Вирішення цієї проблеми лежить у площині інтеграції методів молекулярної біології з цифровою морфометрією та автоматизованим аналізом зображень. Розробка об'єктивних математичних критеріїв дезорганізації колагену із залученням сучасного програмного забезпечення є критично важливою для створення інноваційних систем підтримки прийняття рішень та оптимізації прогнозування перебігу РМЗ.

З огляду на це, акцентування уваги на комплексному вивченні структурно-молекулярного профілю пухлинного мікрооточення визначило напрям нашого дослідження.

Мета дослідження: Ідентифікувати особливості просторової організації і кількісні характеристики колагенової матриці, асоційовані з агресивністю перебігу пухлинного процесу.

Завдання дослідження:

1. Розробити та здійснити апробацію алгоритму верифікації параметрів дезорганізації колагену у тканині РМЗ.
2. Вивчити зв'язок кількісних параметрів дезорганізації колагенових волокон зі ступенем розповсюдженості РМЗ.
3. Проаналізувати залежність експресії маркерів ремоделювання стромального мікрооточення (MMP1, MMP8, TIMP3, LOX) у тканині РМЗ від клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу.
4. Дослідити показники експресії мікроРНК, що беруть участь в регуляції експресії білків ремоделювання колагенової строми, у тканині РМЗ хворих з різним клінічним статусом.
5. Ідентифікувати молекулярно-біологічні ознаки дезорганізації колагену як інформативні атрибути, асоційовані з перебігом РМЗ.

Об'єкт дослідження: рак молочної залози

Предмет дослідження: колагеновий каркас тканини РМЗ та зв'язок його кількісних параметрів із маркерами ремоделювання стромального мікрооточення (MMP1, MMP8, TIMP3, LOX) і мікроРНК, що беруть участь в регуляції експресії білків ремоделювання колагенової строми.

Методи дослідження.

Загальноклінічні (аналіз клініко-патологічних та молекулярних особливостей пухлини, оцінка менопаузального статусу пацієнток, визначення розміру пухлини, стадії захворювання та характеру метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів),

гістоморфологічні та гістохімічні (забарвлення зразків тканин за Маллорі для специфічної візуалізації колагенового матриксу), комп'ютерний морфометричний аналіз та цифрова сегментація зображень (кількісний аналіз параметрів організації колагенових волокон: довжини, ширини, прямолінійності, щільності, орієнтації та показника TSR із використанням програм CurveAlign і ImageJ), імуногістохімічні (дослідження у тканині пухлини рівнів експресії білків ремоделювання стромального мікрооточення MMP1, MMP8, TIMP3 та LOX), молекулярно-генетичні (ПЛР-дослідження експресії мікроРНК, що беруть участь в регуляції експресії білків ремоделювання колагенової стромі), статистичні та математичні (описова статистика, кореляційний аналіз, побудова лінійних та логістичних регресійних моделей для визначення незалежних предикторів метастатичного ураження лімфатичних вузлів та віддалених органів).

Наукова новизна отриманих результатів.

Вперше розроблено та валідовано автоматизований алгоритм верифікації структурних параметрів колагенового каркасу РМЗ, що базується на комплексному гістохімічному визначенні та цифровому аналізі із залученням програмного забезпечення CurveAlign і ImageJ, що дозволило з високою точністю (на масиві понад 1,4 млн волокон) математично охарактеризувати архітекtonіку стромі при злоякісному рості.

Вперше встановлено, що тканина РМЗ, порівняно з доброякісними новоутвореннями (фіброаденомами), характеризується специфічним морфометричним «профілем» дезорганізації колагену: достовірним зменшенням довжини ($p < 0,001$) й ширини ($p < 0,001$) волокон на тлі зростання їх прямолінійності ($p < 0,001$) та орієнтації ($p < 0,05$).

Доведено, що просторова топологія колагенового матриксу безпосередньо віддзеркалює локальне поширення (категорія Т) та метастатичний потенціал (категорія N) РМЗ ($p < 0,001$). Визначено, що

найтісніші кореляційні зв'язки з прогресуванням пухлинного процесу мають ширина колагенових волокон (для категорії T: $r=-0,751$; для категорії N: $r=-0,711$) та їх щільність (для категорії N: $r=0,790$).

Розширено уявлення про ремоделювання пухлинного мікрооточення шляхом встановлення гетерогенності експресії білків MMP1, MMP8, TIMP3, LOX залежно від репродуктивного статусу хворих, молекулярного підтипу та ступеня диференціювання РМЗ (G1–G3).

Вперше побудовано багатофакторні регресійні моделі, які доводять, що комплексні параметри архітекtonіки колагену (ширина, довжина, щільність та індекс TSR) є незалежними об'єктивними предикторами розміру пухлинного вогнища та наявності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах у хворих на РМЗ.

Практичне значення отриманих результатів.

Ідентифіковано кількісні параметри дезорганізації колагену (ширина, щільність волокон, а також зміна індексу TSR), що можуть бути використані як додаткові прогностичні критерії для оцінки ризику регіонарного метастазування, в тому числі, у хворих на початкові стадії РМЗ.

Отримані дані щодо зв'язку показників експресії MMP1, MMP8, TIMP3 та LOX із клініко-патологічними характеристиками РМЗ обґрунтовують доцільність їх використання як потенційних молекулярних маркерів для стратифікації хворих високого ризику прогресії та індивідуалізації тактики лікування.

Розроблено спосіб оцінки ризику розвитку рецидивів у хворих на РМЗ шляхом дослідження експресії COL1A1, COL3A1 та COL12A1 в пухлинній тканині з використанням плагіну IHC profiler програми Image J, що дозволяє проводити стратифікацію пацієнток з високою ймовірністю розвитку рецидиву протягом 36 місяців та сприяє підвищенню якості прогнозування

перебігу пухлинного процесу і підбору тактики лікування на засадах індивідуалізованої терапії.

Розроблений алгоритм комп'ютерної сегментації та морфометричної оцінки колагенового матриксу може бути інтегрований у практичну роботу патологоанатомічних лабораторій та онкологічних центрів як додатковий об'єктивний інструмент цифрової патології для стандартизованої оцінки ступеня агресивності РМЗ.

Матеріали дисертаційного дослідження та створені регресійні моделі є підґрунтям для розробки автоматизованих систем підтримки прийняття клінічних рішень з елементами штучного інтелекту в онкоморфології.

Результати дослідження впроваджені у клінічну практику КНП "Прикарпатський клінічний онкологічний центр Івано-Франківської обласної ради, КНП " Київський міський клінічний онкологічний центр", КНП КОР "Київський обласний онкологічний диспансер", ДНП "Національний інститут раку" з отриманням 12 актів впровадження результатів наукових досліджень.

Для адресного інформування спеціалістів-онкологів та лікарів практичної ланки охорони здоров'я про шляхи та способи імплементації дослідження особливостей топології і кількісних характеристик дезорганізації колагену у тканині РМЗ видано методичні рекомендації «Колагени як предиктивні маркери ефективності хіміотерапевтичного лікування хворих на рак молочної залози молодого віку» (Медот. реком. / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, Є.В. Кашуба, Т.В. Борікун, Т.В. Задворний, В.М. Базась, А.О. Павлова, О.М. Мушій, І.В. Шепеленко, І.М. Тодор, А.Є. Крижанівська, І.Б. Дяків, А.В. Андріїв//Київ, 2023. – 21 с.), а також включено до «Переліку наукової (науково-технічної продукції), призначеної для впровадження досягнень медичної науки у сферу охорони здоров'я» (Випуск 11).

Київ

2025.

С.

85-86.

https://www.testcentr.org.ua/docs/NMF/Перелік_11_2025.pdf

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: «Верифікація ключових патоморфологічних ознак пухлинного росту як інноваційних елементів штучного інтелекту в оптимізації технології діагностики раку молочної залози» (2021-2022, номер держреєстрації 0121U110569), «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» (2022-2023, номер держреєстрації 0122U201203), «Особливості експресії та статус метилування генів ремоделювання стромального мікрооточення у тканині раку молочної залози» (2023-2024, номер держреєстрації 0123U102991).

Особистий внесок здобувача.

У межах дослідження здобувачем особисто опрацьовано актуальні літературні джерела, проаналізовано клініко-патологічні особливості пацієнток із РМЗ, а також сформовано репрезентативну вибірку та відповідну колекцію пухлинної тканини. Використовуючи сучасні цифрові інструменти, автор розробив та практично протестував алгоритм для верифікації структурних порушень колагену в новоутвореннях. Спільно з науковим керівником було окреслено концептуальний план і завдання роботи, а також інтерпретовано отримані дані. Результатом цієї роботи стало розв'язання важливого наукового завдання: визначено молекулярно-біологічні критерії дезорганізації колагену, які є інформативними прогностичними ознаками перебігу РМЗ.

Апробація результатів дисертації.

Апробація результатів дисертації. Отримані під час виконання дисертаційної роботи результати були представлені на таких наукових заходах: BSI Science and Society Conference 2023; 1st International Conference

for Doctoral Students and Young Scientists «OncoPhD» (Люблін, 20–22 жовтня 2023 р.); International Scientific Conference on Medicine and Public Health «Research Week 2023» (Рига, Латвія); науково-практичній конференції «Молодіжна наука заради миру та розвитку» (Чернівці, 8–10 листопада 2023 р.); XX Міжнародній науковій конференції студентів і аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 18–20 квітня 2024 р.); XXI International Conference of Students and Young Scientists «Shevchenkivska Vesna: Advancements in Life Sciences» (Київ, 24–26 квітня 2024 р.); International Research Conference on Medical and Health Care Sciences «Knowledge for Use in Practice» (Рига, Латвія, 26–28 березня 2025 р.); 11th BSI Science and Society Conference 2026.

Публікації.

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 18 наукових праць, зокрема 9 статей, серед яких 3 статті у журналі, що належить до фахових видань із переліку, затвердженого МОН України, 6 публікацій у виданнях, що індексуються наукометричними базами Scopus чи Web of Science, 8 тез конференцій та 1 методичні рекомендації.

Обсяг та структура дисертації.

Дисертацію викладено на 201 сторінці; вона складається з анотації, списку робіт здобувача за темою, вступу, 6 розділів (зокрема огляду літератури, матеріалів і методів, 3 розділів власних досліджень та узагальнення і аналізу отриманих результатів), висновків, списку використаних джерел літератури, що містить 136 найменувань, а також 2 додатки. Робота ілюстрована 16 таблицями та 61 рисунком.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Пухлинна строма, як драйвер розвитку та прогресії злоякісних новоутворень

РМЗ залишається однією з провідних онкологічних патологій у структурі захворюваності та смертності серед жіночого населення. За даними, наведеними у літературі, щороку у світі діагностують понад 2 млн нових випадків РМЗ, а подальше зростання захворюваності прогнозують упродовж наступних десятиліть [1, 2]. В Україні РМЗ також посідає провідні позиції серед злоякісних новоутворень у жінок: за даними Національного канцер-реєстру України, у 2021–2022 рр. під спеціалізованим наглядом перебували понад 160 тис. пацієнток із підтвердженим діагнозом [3, 4]. Основною причиною несприятливих наслідків є прогресування пухлини з формуванням регіонарних і віддалених метастазів [5]. Висока поширеність РМЗ, значна клінічна та молекулярна гетерогенність пухлин, а також ризик метастазування обґрунтовують необхідність подальшого пошуку тканинних і молекулярних маркерів, здатних доповнити традиційні критерії прогнозування перебігу пухлинного процесу.

Окремої уваги потребує РМЗ у пацієнток молодого віку. У клінічній та дослідницькій практиці хворих часто стратифікують за менопаузальним статусом, однак цей показник є лабільним і не завжди повною мірою відображає вікові та клініко-патологічні особливості пухлини [6–8]. Упродовж останніх десятиліть відзначено розширення когорти пацієнток, у яких РМЗ діагностують до 40–45 років [1, 9, 10]. Для цієї вікової групи характерні більша частота низькодиференційованих пухлин, базального молекулярного підтипу, ураження регіонарних лімфатичних вузлів і віддалене метастазування [11]. Порівняно зі старшими пацієнтками, молоді жінки можуть мати гірші показники виживаності, більш виражені віддалені

побічні ефекти лікування та триваліший період відновлення після хіміотерапії [12, 13]. Додатковою проблемою є низька діагностична інформативність мамографії за високої щільності тканини молочної залози, у зв'язку з чим розглядають її комбінування з додатковими методами візуалізації, зокрема, ультразвуковим дослідженням [14]. Сукупність цих обставин підсилює актуальність пошуку об'єктивних характеристик пухлинної тканини, зокрема параметрів її стромального компонента.

Тривалий час злоякісну пухлину розглядали переважно як автономну популяцію трансформованих епітеліальних клітин. Сучасна концепція визначає новоутворення як складну, просторово організовану та динамічну систему, у якій клітини пухлинної паренхіми взаємодіють зі стромальними й імунними клітинами, судинами, гуморальними факторами та позаклітинним матриксом [15–20]. Пухлинне мікрооточення не є пасивним середовищем для канцерогенезу: воно формує умови для виживання трансформованих клітин, регулює їхню проліферацію, метаболічну пластичність, інвазивність, здатність до дисемінації та чутливість до системної терапії [15, 16, 21]. Саме тому фокус сучасних досліджень поступово зміщується від ізольованого аналізу біології пухлинної клітини до вивчення багатовекторних взаємодій у системі «пухлина—мікрооточення—організм» [15, 22–24].

До клітинного компоненту пухлинної строми належать фібробласти, міофібробласти, ендотеліальні та периваскулярні клітини, адипоцити, макрофаги, нейтрофіли, еозинофіли, мастоцити, дендритні клітини, Т- і В-лімфоцити та інші популяції. Неклітинний компонент представлений колагенами, еластином, протеогліканами, ламінінами, фібронектином, гіалуронаном, іншими глікопротеїнами, а також депонованими в матриксі цитокінами і факторами росту [25, 26]. Просторова організація та функціональний стан усіх елементів постійно змінюються під впливом пухлинних клітин, а строма, зі свого боку, здійснює зворотний регуляторний вплив на злоякісно трансформовані клітини.

Фібробласти є одним із основних джерел структурних компонентів позаклітинного матриксу, факторів росту, цитокінів і ферментів ремоделювання. У нормальній молочній залозі вони беруть участь в ембріональному розвитку, підтриманні тканинного гомеостазу, регенерації та функціональній перебудові органу. У тканині злоякісних новоутворень пухлино-асоційовані фібробласти набувають гетерогенних фенотипів і можуть стимулювати проліферацію злоякісних клітин, ангіогенез, формування імуносупресивного середовища, синтез та укладання колагенових волокон, а також утворення фізичних шляхів для інвазії [27, 28]. Вони не лише продукують мономер колагену, фібронектин і протеоглікани, але й визначають просторову архітектуру стромы через скоротливість, механічне натягнення матриксу, секрецію MMP та ферментів крослінкінгу [29, 30].

Імунний інфільтрат також є активним регулятором тканинної архітектури. Макрофаги беруть участь у стимуляції росту епітелію, елімінації пошкоджених клітин, регуляції запальної відповіді та перебудові позаклітинного матриксу. Залежно від функціонального стану вони можуть підтримувати протипухлинну відповідь або, навпаки, сприяти ангіогенезу, інвазії та метастазуванню. Мастоцити, нейтрофіли, еозинофіли та лімфоцити також модулюють сигнальні каскади, протеолітичну активність і метаболізм пухлинних та стромальних клітин [31, 32]. Зміна співвідношення і функціональної поляризації клітин мікрооточення здатна формувати агресивний фенотип новоутворення, пригнічувати протипухлинний імунітет і створювати умови для дисемінації [32].

Адиipoцити у тканині молочної залози виконують не лише механічні й енергетичні функції. Вони беруть участь у депонуванні та локальному метаболізмі гормонів, секретують адипокіни й ліпідні метаболіти та можуть впливати на доступність біологічно активних молекул для клітин паренхіми [33]. Ендотеліальні та периваскулярні клітини забезпечують формування

судинної ніші, тоді як лімфатичні судини створюють один із основних маршрутів раннього поширення РМЗ. Отже, стромальний компонент поєднує механічні, метаболічні, імунні та сигнальні функції, а його перебудова є системною ознакою пухлинної прогресії.

Важливою властивістю пухлинного мікрооточення є його здатність до формування преметастатичної ніші. Фібробласти, імунні клітини та пухлинні екзосоми можуть змінювати склад і функціональний стан тканин віддалених органів ще до потрапляння циркулюючих пухлинних клітин [34, 35]. Ремоделювання локального імунного середовища, накопичення фібронектину й колагену, зміна судинної проникності та залучення мієлоїдних клітин створюють сприятливі умови для адгезії, виживання й подальшого росту дисемінованих клітин. Таким чином, пухлинна строма бере участь не лише в локальному інвазивному рості, а й у просторово віддалених етапах метастатичного каскаду.

Фенотип пухлино-асоційованих стромальних клітин формується під дією генетичних, епігенетичних і метаболічних чинників. У стромальних клітинах РМЗ виявлено специфічні епігенетичні модифікації, здатні змінювати експресію факторів росту та драйверів канцерогенезу у пухлинних клітинах [36]. Окреме значення має везикулярна комунікація: пухлинні клітини секретують екзосоми з мікроРНК, білками та метаболітами, які активують фібробласти, поляризують макрофаги й сприяють ремоделюванню позаклітинного матриксу. У відповідь стромальні клітини також продукують сигнальні молекули, що підтримують проліферативні та інвазивні властивості пухлини [37–39]. Такий реципрокний характер взаємодій пояснює функціональну пластичність мікрооточення й складність його терапевтичної модифікації.

Позаклітинний матрикс є структурною основою строми та одночасно активною сигнальною платформою. У нормальній молочній залозі компоненти базальної мембрани підтримують полярність епітелію, і

диференціювання та можуть чинити супресорний вплив на клітинну проліферацію. Під час пухлинної прогресії базальна мембрана деградує, а в інтерстиціальній стромі посилюються синтез, накопичення та зшивання фібрилярних білків [18, 40]. Унаслідок цього змінюються жорсткість тканини, локальна гіпоксія, транспорт поживних речовин і лікарських засобів, доступність депонованих факторів росту та механотрансдукція. Отже, кількісні й просторові зміни позаклітинного матриксу можуть не лише відображати перебіг пухлинного процесу, а й безпосередньо його спрямовувати.

Клінічне значення стромы підтверджує пухлинно-стромальне співвідношення (tumour–stroma ratio, TSR). Низькі значення TSR, тобто відносно велика частка стромального компонента, асоціювалися з несприятливими показниками загальної та безрецидивної п'ятирічної виживаності хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів [41]. Водночас проста кількісна оцінка частки стромы не враховує її якісний склад, ступінь активації клітин, щільність і орієнтацію колагенових волокон, активність ферментів ремоделювання та молекулярні механізми регуляції. Тому перспективним є перехід від одномірних гістологічних показників до інтегрованого аналізу клітинних, молекулярних і морфометричних характеристик.

На стан пухлинного мікрооточення впливають також системні фактори організму. Поряд із генетичною схильністю, гормональним дисбалансом, способом життя та метаболічними порушеннями дедалі частіше розглядають роль хронічного психоемоційного стресу, який через нейроендокринні та імунні механізми може змінювати поведінку пухлинних і стромальних клітин [42, 43]. Хоча безпосередній внесок стрес-індукованих змін у колагенову архітектуру РМЗ потребує подальшого вивчення, ця концепція додатково підкреслює, що строма є відкритою динамічною системою, чутливою до локальних і системних сигналів.

Таким чином, пухлинна строма є не пасивним каркасом, а одним із ключових драйверів розвитку та прогресії злоякісних новоутворень. Її клітинні й неклітинні компоненти координують проліферацію, ангиогенез, імунну відповідь, інвазію, формування метастатичних ніш і резистентність до терапії. Найважливішою морфофункціональною складовою строми є колагеновий матрикс, стан якого визначається балансом синтезу, протеолітичної деградації, крослінкінгу та просторової реорганізації. Саме ферментативні механізми цієї перебудови становлять основу наступного напрямку аналізу.

1.2. Білки ремоделювання позаклітинного матриксу: механізми реорганізації пухлинної строми та їх зв'язок із перебігом злоякісних новоутворень

Гомеостаз позаклітинного матриксу забезпечується динамічною рівновагою між синтезом його компонентів, їх укладанням у надмолекулярні структури, посттрансляційною модифікацією, протеолітичною деградацією та утилізацією. За фізіологічних умов ці процеси підтримують механічні властивості тканини, просторову полярність клітин і контрольоване вивільнення біологічно активних молекул. У злоякісних новоутвореннях рівновага порушується: одночасно відбуваються деградація нормального матриксу, надмірний синтез фібрилярних білків, посилення їх зшивання й формування пухлино-специфічної архітектоніки [44–46]. Це призводить до підвищення жорсткості тканини, лінеаризація волокон, появі напрямлених шляхів для міграції та зміни клітинного сигналіngu.

До основних білків ремоделювання колагенового матриксу належать MMP, TIMP, лізілоксидози (LOX/LOXL), ферменти родини проколаген-лізин, 2-оксоглутарат-5-діоксигенази (PLOD), а також катепсини, меприни й

інші протеази. Їх координована активність визначає не тільки загальну кількість колагену, а й довжину, товщину, ступінь зшивання, орієнтацію та стійкість волокон до деградації. Саме тому ізольоване визначення експресії одного ферменту не завжди відображає реальний стан позаклітинного матриксу; більш інформативним є аналіз функціонального балансу між протеолізмом і стабілізацією матриксу.

ММР — це родина мультидоменних цинк-залежних ендопептидаз, які здійснюють специфічний протеоліз компонентів позаклітинного матриксу і низки розчинних сигнальних молекул. За структурними особливостями та переважною субстратною специфічністю виділяють колагенази, желатинази, стромелізени, матрилізени, мембранні ММР та інші підгрупи [47–49]. До класичних колагеназ належать ММР-1, ММР-8 і ММР-13, тоді як ММР-2 та ММР-9 є желатиназами. Такий поділ є функціонально важливим: колагенази здатні ініціювати розщеплення інтактної потрійної спіралі фібрилярного колагену, а желатинази ефективно деградують денатуровані фрагменти колагену й компоненти базальної мембрани [50].

Колагенази здійснюють початковий критичний етап колагенолізу, розщеплюючи нативну молекулу фібрилярного колагену в характерній ділянці з утворенням фрагментів приблизно $3/4$ та $1/4$ її довжини [50]. ММР-1 має виражену активність щодо колагенів I, II і III типів, але також може розщеплювати желатин, агрекан, ентактин, тенасцин, фібронектин і вітронектин [51]. ММР-8 діє на колагени I–III типів, нефібрилярні колагени IX, XII і XIV типів, а також на ламінін, фібронектин, тенасцин C, агрекан і низку розчинних медіаторів [52]. ММР-13 вирізняється високою протеолітичною активністю, особливо щодо колагену II типу, але її субстратний спектр включає також колагени I, III, IV, IX, X і XIV типів, желатин, фібронектин, агрекан, остеонектин, тенасцин і плазміноген [51, 53].

Функції ММР у канцерогенезі не обмежуються механічним утворенням проходів у матриксі. Протеолітичне розщеплення позаклітинного

матриксу супроводжується появою біологічно активних фрагментів — матрикінів, які можуть діяти як хемоатрактанти, регулятори міграції та модифікатори клітинного фенотипу [54, 55]. Одночасно ММР вивільняють депоновані у матриксі форми TGF- β , VEGF, FGF та інших факторів, переводячи локальне ремоделювання у стан стійкої проліферативної й ангіогенної стимуляції [56, 57]. Отже, протеоліз є не лише наслідком інвазії, а й активним механізмом сигнального перепрограмування пухлинних і стромальних клітин [58].

ММР-1 та ММР-13 беруть безпосередню участь у формуванні інвазивного фронту шляхом деградації інтерстиціального колагену I типу й активації інтегрин-залежних та MAPK-сигнальних шляхів. Підвищена експресія ММР-1 у пухлиноасоційованих фібробластах РМЗ асоціювалася з прогресуванням пухлини та несприятливим прогнозом [59]. Водночас вплив окремих ММР є контекст-залежним. Для ММР-8, поряд із проінвазивними ефектами, описано потенційну антиметастатичну активність, опосередковану сигнальною віссю декорин—мікроРНК-21 [60, 61]. Це свідчить, що прогностичне трактування експресії ММР має враховувати клітинне джерело походження ферменту, його активовану чи неактивну форму, субстратне оточення та стадію пухлинного процесу.

Желатинази ММР-2 і ММР-9 забезпечують деградацію денатурованого колагену та колагену IV типу у складі базальної мембрани. Їх активація сприяє інвазії пухлинних клітин, ангіогенезу та лімфогенному метастазуванню. У тканині РМЗ із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів виявляли вищі рівні експресії обох желатиназ [62]. ММР-9 бере участь у ремоделюванні базальної мембрани судин, мобілізації VEGF і рекрутингу ендотеліальних клітин, а її гіперекспресія у багатьох пухлинах корелює з інтенсивністю неоангіогенезу та несприятливим прогнозом [63]. При цьому ММР-9 здатна вибірково розщеплювати механічно пошкоджені

або частково денатуровані ділянки колагенових фібрил, поєднуючи процеси фізіологічної регенерації та пухлинного ремоделювання [64].

Між синтезом і деградацією колагену існують компенсаційні зворотні зв'язки. Формування фібрилярного колагену з мономерів може стимулювати активацію MMP-2 у фібробластах, що запобігає надмірному накопиченню волокон [65]. Водночас активована стромальна MMP-2 здатна підвищувати експресію колагену 1 типу (COL1A1) і сприяти росту метастатичних вогнищ [66]. Такий двосторонній зв'язок пояснює, чому підвищена протеолітична активність не завжди супроводжується зменшенням кількості колагену: у пухлині можуть одночасно посилюватися деградація існуючого матриксу та синтез нового, функціонально зміненого колагенового каркасу.

MMP також впливають на епітеліально-мезенхімальний перехід (ЕМП). MMP-1, MMP-2 та MMP-9 можуть модифікувати міжклітинні контакти шляхом протеолізу адгезивних молекул і активації TGF- β -залежного сигналіngu. Це сприяє втраті епітеліальної полярності, зменшенню експресії Е-кадгерину, підвищенню клітинної пластичності та формуванню інвазивного фенотипу [67]. Крім того, MMP протеолітично модифікують цитокіни, хемокіни та рецептори імунних клітин, беручи участь у формуванні імуносупресивного мікрооточення [68]. Таким чином, матриксини інтегрують структурні, сигнальні, ангіогенні й імуnoreгуляторні механізми пухлинної прогресії.

Ремоделювання позаклітинного матриксу впливає також на протипухлинну імунну відповідь. Колагенові структури здатні модулювати активність і просторовий розподіл імунних клітин, тоді як надмірне накопичення та перебудова матриксу можуть підтримувати механізми імунного уникнення пухлини [44, 46].

Ендогенний контроль активності MMP забезпечують тканинні інгібітори металопротеїназ TIMP-1—TIMP-4. Вони утворюють нековалентні

комплекси з активними формами MMP і обмежують неконтрольований протеоліз матриксу [47, 48]. Особливе місце посідає TIMP3, який зв'язується з компонентами позаклітинного матриксу і локально регулює активність не лише MMP, але й представників інших родин металопротеаз. Відповідно, біологічний наслідок ремоделювання визначається не абсолютною експресією окремої MMP, а співвідношенням протеази та її інгібітора, просторовою колокалізацією цих білків і доступністю субстрату. Порушення балансу MMP/TIMP може сприяти як надмірному руйнуванню матриксу, так і патологічному накопиченню та реорганізації колагену.

Протилежну до протеолізу функціональну вісь формують лізилоксидази. Родина включає власне лізилоксидазу LOX та чотири LOX-подібні білки LOXL1–LOXL4. Це позаклітинні мідьзалежні аміноксидази, які здійснюють посттрансляційну модифікацію колагенів і еластину [69, 70]. Консервативна С-кінцева ділянка містить мідьзв'язувальний домен, структури, необхідні для формування кофактора лізил-тирозилхінону, та цитокіноподібний рецепторний домен. Відмінності N-кінцевих ділянок дають підстави поділяти родину на дві підгрупи: LOX/LOXL1 та LOXL2–LOXL4 [71].

LOX і LOXL1 переважно діють на фібрилярні колагени I і III типів та еластин і функціонально взаємодіють із BMP-1, фібронектином, фібулінами 4 і 5 та тропоеластином [71, 72]. LOXL2–LOXL4 містять консервативні scavenger receptor cysteine-rich домени, завдяки яким можуть мати ширший спектр білок-білкових взаємодій, впливати на колаген IV типу базальної мембрани та модулювати жорсткість позаклітинного матриксу. Функціональна спеціалізація членів цієї родини пояснює відмінності їх участі в нормальному тканинному гомеостазі та канцерогенезі.

Механізм дії LOX полягає в окисненні пептидиллізинових залишків колагену з утворенням реакційноздатних алізинових альдегідів. Подальші реакції конденсації та неферментативні перебудови приводять до

формування стабільних міжмолекулярних ковалентних зшивок, зокрема піридиноліну та дезоксипіридиноліну [73]. Зшивання підвищує механічну міцність і жорсткість матриксу, змінює діаметр та упаковку фібрил і водночас зменшує їх доступність для протеолітичної деградації MMP. Отже, активність LOX безпосередньо впливає на морфометричні показники колагенових волокон і може змінювати механічні умови існування пухлинних клітин.

LOX експресується фібробластами, адипоцитами, ендотеліальними, епітеліальними, гладком'язовими та іншими клітинами. У пухлинах різного гістогенезу підвищені рівні LOX/LOXL асоціювалися з проліферативною активністю, ангіогенезом, інвазією та метастазуванням, хоча для окремих контекстів описано і потенційні пухлино супресорні властивості [74]. За умов гіпоксії LOX може підтримувати сигнальну вісь CD44—Twist, а також впливати на транскрипцію SNAI2/SLUG, пригнічення E-кадгерину та активацію ЕМП [75]. Надмірна експресія LOXL2 або LOXL3 також пов'язана з індукцією мезенхімального фенотипу, тоді як LOXL3 сприяє інвазивності й метастазуванню PM3 [75, 76].

У клітинах PM3 LOX може модулювати сигнальні взаємодії між протеазою HTRA1, TGF- β 1, матриліном-2 та рецептором EGF, підвищуючи чутливість пухлинних клітин до лігандів сімейства EGF і стимулюючи ріст новоутворення [76]. Крім локальної дії, секретовані первинною пухлиною LOX можуть циркулювати у розчинній формі або у складі позаклітинних везикул. У віддалених органах вони модифікують позаклітинного матриксу і сприяють формуванню преметастатичної ніші, придатної для колонізації циркулюючими пухлинними клітинами [77]. Цей механізм поєднує перебудову стромы первинної пухлини з підготовкою тканини-мішені до метастазування.

Важливим є взаємозв'язок активності MMP і LOX із віком хворих. Для PM3 продемонстровано залежність патерну експресії MMP-2 та MMP-9

від віку пацієнток [78]. У сполучній тканині пацієнтів старшого віку змінюються склад, ступінь модифікації та чутливість колагену до протеолізу. Колаген, виділений зі старіючої тканини, може інакше впливати на проліферацію й апоптоз пухлинних клітин, а підвищення активності мембранозв'язаної MT1-MMP здатне нівелювати частину цих ефектів [79]. Це обґрунтовує необхідність урахування віку під час інтерпретації експресії білків ремоделювання та морфометричних характеристик стромы.

Поряд із MMP і LOX у формуванні колагенового каркасу беруть участь PLOD-ферменти, що гідроксильють лізинові залишки проколагену й визначають подальшу ефективність зшивання, а також катепсини та меприни, які розщеплюють матриксні білки у позаклітинному просторі або після ендоцитозу [46]. Їх функції утворюють єдину мережу з MMP, TIMP і LOX. Зміщення рівноваги в бік надмірної деградації призводить до втрати тканинної організації та полегшення інвазії, тоді як домінування синтезу й крослінкінгу формує фіброзні, жорсткі та гіпоперфузовані ділянки, що обмежують проникнення терапевтичних агентів.

Прогностичний потенціал білків ремоделювання підтверджено для різних представників родини MMP. За результатами систематичного огляду й метааналізу, гіперекспресія окремих MMP може бути пов'язана з несприятливим перебігом РМЗ [80]. MMP-1 розглядають як потенційну мішень для пригнічення екстравазації клітин потрійно-негативного РМЗ; одним із можливих регуляторів цього процесу є мікроРНК-623 [81]. Водночас суперечливі ефекти MMP-8, LOX та інших ферментів свідчать, що для клінічного застосування недостатньо визначати лише рівень окремого транскрипту чи білка. Необхідне поєднання молекулярних даних із локалізацією експресії, активністю ферменту, клініко-патологічними характеристиками та безпосередніми показниками структури колагенового матриксу.

Отже, білки ремоделювання позаклітинного матриксу створюють функціональну вісь, яка визначає руйнування, повторний синтез, укладання та стабілізацію колагенових волокон. Через зміну жорсткості, вивільнення факторів росту, утворення матрикінів, активацію ЕМП, ангіогенезу та імунної модуляції вони безпосередньо впливають на агресивність пухлинного процесу. Найперспективнішим підходом до оцінки їх прогностичного значення є інтеграція експресії MMP, TIMP і LOX із кількісними характеристиками колагену та особливостями клінічного перебігу захворювання.

1.3. Колагеновий матрикс як детермінанта злоякісності та терапевтичної резистентності новоутворень

Колагени утворюють велику надродину структурно споріднених білків, до якої належать 28 типів. Їх спільною ознакою є повторювана амінокислотна послідовність Gly–X–Y, де у положеннях X і Y часто містяться пролін та гідроксипролін, а також характерна четвертинна структура — потрійна спіраль із трьох α -ланцюгів [82]. За структурою та функціями колагени поділяють на фібрилярні, фібрил-асоційовані колагени з перерваними потрійними спіралями (FACIT), сіткоутворювальні та колагени базальних мембран. Така різноманітність забезпечує не лише механічну міцність тканин, а й регуляцію адгезії, полярності, міграції, диференціювання та виживання клітин.

У молочній залозі колаген є основним фібрилярним компонентом позаклітинного матриксу. Його мономери синтезують переважно фібробласти, після чого вони зазнають внутрішньоклітинних посттрансляційних модифікацій, секретуються та укладаються у фібрили й волокна. У нормальній тканині колагеновий каркас підтримує просторову

організацію епітелію та судин, забезпечує механічну цілісність і бере участь у передачі сигналів через інтегрини, дискоїдинові рецептори та інші матрикс-чутливі системи [29, 83]. При злоякісному рості ці функції набувають патологічного характеру: змінені кількість, склад, ступінь зшивання й орієнтація колагену формують мікрооточення, сприятливе для інвазивного росту. Відтворення такого складу позаклітинного матриксу є важливою умовою створення адекватних експериментальних моделей РМЗ [84].

Домінантним фібрилярним білком строми РМЗ є COL1A1. Його класична гетеротримерна молекула складається з двох $\alpha 1(I)$ - та одного $\alpha 2(I)$ -ланцюга, хоча можливе утворення гомотримерів, які частіше виявляють у фіброзних ураженнях, ембріональних тканинах і деяких пухлинах [85, 86]. Гомо- та гетеротримерні форми відрізняються стабільністю, здатністю до фібрилоутворення і чутливістю до протеолізу, тому зміна їх співвідношення потенційно впливає на архітектоніку та механічні властивості пухлинної строми.

Накопичення й посилене зшивання COL1A1 збільшують жорсткість пухлинної тканини. Жорсткий матрикс активує інтегрин-опосередковану механотрансдукцію, перебудову цитоскелету, фокальну адгезію та сигнальні каскади, що стимулюють проліферацію, міграцію і виживання трансформованих клітин. Одночасно ущільнення строми погіршує перфузію, посилює гіпоксію, створює напрямлені траєкторії для руху клітин і обмежує проникнення терапевтичних агентів до пухлинної паренхіми [87, 88]. Залежність проліферації, відповіді на хіміотерапію та переходу пухлинних клітин у стан спокою від жорсткості матриксу показує, що колагенова строма є одночасно регулятором злоякісності та фактором медикаментозної резистентності.

Важливою регуляторною віссю є взаємозв'язок COL1A1 з трансформуючим фактором росту бета 1 (TGF- β 1). Активація TGF- β -сигналінгу посилює синтез COL1A1, диференціювання фібробластів у

міофібробласти та фіброз, тоді як збільшення щільності колагенового матриксу підтримує механічне вивільнення й активацію TGF- β . Такий позитивний зворотний зв'язок сприяє ЕМП, проліферації та формуванню стійкого профібротичного фенотипу стромы [85]. Отже, зміни експресії COL1A1 мають оцінюватися не ізольовано, а разом із локальною організацією волокон і активністю факторів ремоделювання.

Колаген III типу (COL3A1) є другим за поширеністю фібрилярним колагеном і важливою складовою інтерстиціального матриксу [89]. Він часто коасемблюється з COL1A1, утворюючи гетеротипові фібрили I/III, регулює їх діаметр, зшивання та механічну податливість [90–92]. Відповідно, зміна співвідношення COL1A1/COL3A1 може впливати не лише на загальний вміст колагену, а й на товщину, пружність та просторову організацію волокон.

Окремою функцією COL3A1 є підтримання стану пухлинного спокою (tumour dormancy). COL3A1-збагачена ніша може обмежувати проліферацію дисемінованих клітин, тоді як руйнування такого матриксу активує проліферативні, автофагічні й міграційні програми через DDR1- і STAT1-залежний сигналінг [93, 94]. Ці дані демонструють, що збільшення вмісту колагену не завжди має однозначно протуморний ефект: біологічний ефект залежить від типу колагену, його надмолекулярної організації, стадії пухлинного процесу та рецепторного профілю клітин.

Результати рап-сансер аналізу свідчать, що підвищена експресія COL3A1 у багатьох типах пухлин асоціюється з пізньою стадією, несприятливим прогнозом і вираженою інфільтрацією нейтрофілами, макрофагами, CD4⁺ - і CD8⁺ -Т-клітинами, дендритними та В-клітинами [95]. COL3A1 також пов'язаний зі взаємодією клітин із позаклітинним матриксом, регуляцією актинового цитоскелету та фокальною адгезією. Таким чином, COL3A1 може виконувати різні функції залежно від просторового й клітинного контексту: підтримувати стан спокою окремих

дисемінованих клітин, але водночас бути ознакою активованої стромы у сформованій пухлині.

Біологічне значення колагену визначається не лише його кількістю та типом, а й морфометричними і топологічними характеристиками волокон. До найбільш інформативних параметрів належать довжина, ширина, прямолінійність, щільність, ступінь вирівнювання, кут орієнтації відносно пухлинної паренхіми та взаємна узгодженість напрямків волокон [20, 96, 97]. Ремоделювання під час пухлинного росту супроводжується деградацією нормального позаклітинного матриксу, синтезом нового колагену, зшиванням, лінеаризацією та переорієнтацією волокон. Найбільш виражені зміни виникають на межі пухлина—строма, де механічні сили й протеолітична активність формують інвазивний фронт [44, 45].

Для РМЗ описано підвищення ентропії просторової організації колагену, зміну форми волокон та втрату характерної для нормальної тканини впорядкованості [98]. Ці зміни відображають не просте збільшення або зменшення кількості колагену, а якісну реорганізацію стромального каркасу в процесі малігнізації.

У перитуморальній зоні РМЗ виявлено вирівнювання й випрямлення волокон одне відносно одного, особливо на межі пухлини та незміненої тканини [100]. Така архітектура може полегшувати колективну та індивідуальну міграцію клітин, оскільки паралельні або радіально орієнтовані волокна формують фізичні траєкторії руху від пухлинного вузла до навколишньої тканини. Важливо, що ці зміни можуть бути локальними й найбільш вираженими безпосередньо у пухлинному мікрооточенні, що підсилює їх потенційне значення для диференційної діагностики та визначення інвазивного потенціалу [101].

Спостереження при інших злоякісних новоутвореннях свідчать, що порушення організації колагену може виявлятися не лише безпосередньо в

пухлинному вузлі: зміни волокон описано також у гістологічно неураженій слизовій оболонці товстої кишки на відстані від злоякісної пухлини [83].

Морфометричні характеристики колагену мають прогностичне значення при різних злоякісних новоутвореннях. Для потрійно-негативного РМЗ встановлено зв'язок довжини та щільності волокон із показниками виживаності [102]. У пухлинах голови та шиї, стравоходу, товстої і прямої кишки збільшення середньої довжини волокон також асоціювалося з несприятливим перебігом [103]. Це свідчить, що певні принципи стромального ремоделювання можуть бути спільними для пухлин різного гістогенезу, хоча порогові значення й напрямок окремих асоціацій залежать від тканини та методики аналізу.

Клінічну перспективність кількісного аналізу підтверджують дослідження пухлин-асоційованих колагенових сигнатур. Комп'ютерна оцінка таких сигнатур підвищувала точність прогнозування перебігу РМЗ, а їх масштабний аналіз дозволяв ідентифікувати групи пацієнток високого ризику [104, 105]. Окремо показано, що параметри колагенового каркасу, отримані зі світлопольних гістологічних зображень, пов'язані із загальною виживаністю хворих на РМЗ [106].

При протоковій аденокарциномі молочної залози *in situ* нижчий ризик рецидиву спостерігали у пацієнток із ширшими, менш прямими та щільніше розташованими колагеновими волокнами [107]. Архітектура колагену також була пов'язана з мамографічною щільністю та ступенем ураження у жінок, яким виконували біопсію під контролем візуалізації [101]. Разом із даними щодо пухлинно-стромального співвідношення ці результати підтверджують, що кількісні та просторові характеристики строми можуть доповнювати стандартні патоморфологічні показники.

Вікові зміни колагену додатково модулюють його вплив на пухлинні клітини. При РМЗ волокна колагену, виділені зі сполучної тканини молодих і

дорослих тварин, пригнічували проліферацію та активували апоптоз, тоді як колаген старих тварин змінював цю відповідь. Експресія мембранозв'язаної MT1-MMP могла нівелювати частину ефектів колагену через модифікацію DDR1-залежного сигналіngu [79]. Отже, вік пацієнтки може впливати на морфологію волокон, ступінь їх зшивання та біологічну відповідь пухлинних клітин, що особливо важливо для дослідження РМЗ у молодих жінок.

Зв'язок колагену з чутливістю до терапії має декілька взаємопов'язаних механізмів. По-перше, щільний і жорсткий матрикс створює фізичний бар'єр для дифузії низькомолекулярних препаратів, антитіл і наночастинок. По-друге, компресія судин погіршує перфузію та підтримує гіпоксію, яка активує програми виживання, ЕМП і медикаментозної резистентності. По-третє, механотрансдукція через інтегрини, FAK та цитоскелет посилює антиапоптотичні сигнали. По-четверте, колагенові рецептори можуть підтримувати стан спокою дисемінованих клітин, у якому вони є менш чутливими до препаратів, орієнтованих на клітини, що активно діляться [88, 93]. Тому морфофункціональний стан колагену потенційно може бути як предиктивним маркером, так і терапевтичною мішенню.

Для вивчення колагену у гістологічних зрізах традиційно використовують трихромні гістохімічні забарвлення за ван Гізоном, Массоном і Маллорі, а також імуногістохімічне виявлення окремих типів колагену та гібридизацію *in situ* [108]. Загалом, патоморфологічне дослідження залишається базовим способом об'єктивної оцінки тканинної організації [109]. Ці методи є відносно доступними та придатними для рутинної практики, однак багатоступенева обробка тканини може спричиняти артефакти й залежить від стандартизації преаналітичного етапу та кваліфікації персоналу [104, 105]. Забарвлення гематоксиліном та еозином добре відображає загальну гістоархітектоніку, але не забезпечує специфічної

диференціації колагену від інших волокнистих компонентів, зокрема еластину.

Високоспецифічним методом прямої візуалізації фібрилярного колагену є мікроскопія генерації другої гармоніки (second harmonic generation, SHG), яку реалізують на платформі двофотонної мікроскопії [106, 110, 111]. Метод не потребує екзогенних барвників і характеризується низькою фототоксичністю, а поляризаційні модифікації SHG дають змогу досліджувати ультраструктурні зміни колагену [112]. Іншим підходом є поляризаційна мікроскопія зрізів, забарвлених піросиріусом червоним, яка підсилює контраст і дозволяє оцінювати орієнтацію та відносну товщину волокон [113]. Обмеженнями цих технологій є висока вартість обладнання, потреба в кваліфікованому персоналі та складність уніфікації протоколів між лабораторіями.

Поряд з оптичними методами розробляють підходи до молекулярної візуалізації, спрямовані безпосередньо на колаген. Можливість колаген-специфічної магнітно-резонансної візуалізації продемонстровано на моделі раку передміхурової залози, що підтверджує потенціал неінвазивної оцінки матриксу [30].

Кількісне опрацювання мікрофотографій здійснюють із використанням ImageJ, FibrilTool, OrientationJ, MATLAB, CytoSpectre, CurveAlign, CT-FIRE, FiberFit та інших програмних пакетів [114]. Вони забезпечують сегментацію зображень, виділення окремих волокон і розрахунок їх довжини, ширини, прямолінійності, орієнтації та щільності. Запропонований авторським колективом підхід поєднує відносно доступне гістохімічне забарвлення за Маллорі, світлову мікроскопію та комп'ютерну морфометрію, що потенційно спрощує впровадження аналізу колагену у лабораторіях без SHG-обладнання [99].

Автоматизовані системи аналізу цифрових гістологічних зображень здатні зменшити суб'єктивність оцінки та розширити кількість досліджуваних ділянок. Для класифікації й прогнозування застосовують штучні нейронні мережі, кластерний аналіз, глибоке навчання та нечіткі методи [106, 115–119]. Водночас надійність моделі залежить від якості сегментації, репрезентативності тренувальної вибірки, стандартизації забарвлення та чіткої клініко-морфологічної верифікації цільових ознак. Морфометричні параметри повинні бути пов'язані з описовими даними про пацієнтку, молекулярним підтипом, стадією, метастатичним статусом і результатами лікування; лише за таких умов можливе створення клінічно корисного класифікатора.

Таким чином, колаген є активним регулятором біології злоякісних новоутворень. Його специфічний склад, кількість, ступінь зшивання, жорсткість і просторова орієнтація визначають умови проліферації, інвазії, метастазування, пухлинного спокою та відповіді на лікування. Водночас жоден окремий морфометричний параметр не може повністю описати функціональний стан стромы. Перспективним є інтегрований аналіз довжини, ширини, прямолінійності й орієнтації волокон разом з експресією COL1A1, COL3A1, білків ремоделювання та клініко-патологічними характеристиками пухлини.

1.4. Регуляція експресії генів колагенового матриксу: генетичні та епігенетичні механізми формування архітектоніки пухлинної стромы

Архітектоніка пухлинної стромы формується внаслідок координованої експресії генів структурних білків, ферментів синтезу, крослінкінгу й деградації позаклітинного матриксу, а також молекул міжклітинної комунікації. Ця регуляція відбувається на декількох рівнях:

транскрипційному, посттранскрипційному, епігенетичному та посттрансляційному. На відміну від стабільної генетичної мутації, епігенетичні зміни є потенційно оборотними та залежать від клітинного контексту, гіпоксії, запалення, механічного навантаження й сигналів, що надходять від пухлинних клітин. Саме це забезпечує високу пластичність стромы впродовж розвитку та лікування новоутворення.

Одним із центральних транскрипційних регуляторів фіброзу є TGF- β -сигналінг. Активація рецепторів TGF- β у фібробластах стимулює їх перехід у міофібробластний стан, підвищує експресію COL1A1, COL3A1, фібронектину, PLOD і LOX та одночасно змінює профіль MMP/TIMP. Накопичення й механічне натягнення колагену, зі свого боку, сприяють активації латентного TGF- β , формуючи самопідтримувальний профібротичний контур. Для COL1A1 описано взаємопідсилюючий зв'язок із TGF- β 1, який одночасно сприяє ЕМП та проліферації трансформованих клітин [85].

Експресія COL1A1 і COL3A1 відображає різні, але функціонально пов'язані аспекти формування фібрил. COL1A1 кодує основний α 1-ланцюг колагену I типу, що визначає механічну міцність стромы, тоді як COL3A1 кодує α 1-ланцюг колагену III типу, який регулює діаметр і податливість гетеротипових фібрил I/III [89–92]. Підвищення транскрипції обох генів може свідчити про активацію стромы, однак функціональний наслідок залежить від їх співвідношення, ефективності секреції проколагену, активності PLOD/LOX, протеолізу MMP і просторової організації сформованих волокон.

Ran-cancer дослідження показали, що гіперекспресія COL3A1 у пухлинній тканині пов'язана з прогресуванням захворювання, несприятливим прогнозом, ремоделюванням фокальної адгезії та імунною інфільтрацією [95]. Для COL1A1 описано асоціації з підвищеною жорсткістю матриксу, TGF- β -залежним ЕМП і терапевтичною резистентністю [85, 87,

88]. Водночас рівень мРНК не тотожний кількості функціональних волокон: на кінцевий фенотип строми впливають трансляція, посттрансляційні модифікації, збирання потрійної спіралі, секреція, фібрилогенез, крослінкінг і деградація. Тому генетичні показники мають інтерпретуватися у зв'язку з морфометрією колагену.

Стромальні клітини пухлини можуть мати епігенетичний профіль, відмінний від відповідних клітин нормальної тканини. У фібробластах РМЗ виявлено зміни метилювання ДНК та хроматинової регуляції, які підтримують стабільну експресію цитокінів, факторів росту та ферментів ремоделювання навіть за відсутності безпосереднього контакту з пухлинними клітинами [36]. Така «епігенетична пам'ять» може сприяти збереженню активованого фенотипу строми, формуванню локального запалення й відновленню пропухлинного мікрооточення після терапевтичного втручання.

Важливим посттранскрипційним рівнем регуляції є мікроРНК — короткі некодуючі РНК, які зв'язуються з комплементарними послідовностями мРНК та пригнічують їх трансляцію або сприяють деградації транскрипту. Відкриття lin-4 наприкінці XX століття започаткувало уявлення про мікроРНК як про універсальні регулятори генетичних програм [120]. Подальші дослідження показали, що одна мікроРНК може впливати на багато мішеней, а один транскрипт може одночасно регулюватися декількома мікроРНК. Завдяки цьому мікроРНК координують цілі сигнальні мережі, залучені до проліферації, апоптозу, диференціювання, стресової відповіді та клітинної пластичності [121].

У РМЗ мікроРНК регулюють як внутрішньоклітинні програми пухлинних клітин так і склад та функціональний стан мікрооточення. Вони впливають на активацію фібробластів, поляризацію макрофагів, поведінку мастоцитів, ангіогенез, інфільтрацію імунних клітин і ремоделювання позаклітинного матриксу [122–125]. Завдяки одночасному контролю

структурних генів і сигнальних каскадів мікроРНК можуть інтегрувати молекулярні зміни з кінцевим морфологічним фенотипом стромы.

МікроРНК передаються між клітинами у складі екзосом та інших позаклітинних везикул, що захищає їх від деградації та забезпечує адресну доставку. Пухлинні екзосомы можуть активувати нормальні фібробласти й перетворювати їх на пухлиноасоційовані. Зокрема, для екзосомальної мікроРНК-146а описано здатність до активації фібробластів та посилення інвазії і метастазування РМЗ [38]. У зворотному напрямку пухлиноасоційовані фібробласти секретують екзосомальну мікроРНК-500а-5р, яка через пригнічення *USP28* стимулює проліферацію та метастатичні властивості клітин РМЗ [39]. Це створює замкнені петлі комунікації, у яких пухлина програмує строму, а строма стабілізує агресивний фенотип пухлини.

Екзосомальні мікроРНК беруть участь також у поляризації імунних та мезенхімальних клітин. Пухлинне походження окремих мікроРНК може сприяти формуванню М2-подібного фенотипу макрофагів або перетворенню тканинних зірчастих клітин на активовані фібробласти [37, 124]. Хоча частина цих механізмів описана для інших солідних пухлин, вони демонструють загальний принцип: везикулярна передача мікроРНК здатна дистанційно перебудовувати клітинний склад і матрикс мікрооточення.

Особливе значення мають мікроРНК, які безпосередньо регулюють ферменти ремоделювання. МікроРНК-623 пригнічує ММР-1 і може зменшувати екстравазацію клітин потрійно-негативного РМЗ у моделях метастазування до головного мозку [81]. Для ММР-8 описано антиметастатичний механізм, пов'язаний із декорином та мікроРНК-21 [60]. Ці приклади свідчать, що зміни рівня мікроРНК можуть впливати на морфологію колагенового каркасу опосередковано — через контроль протеолізу, доступності матрикінів і сигнальної активності факторів росту.

МікроРНК можуть впливати і на синтетичні та крослінкінгові ланки ремоделювання, регулюючи транскрипцію колагенів, TGF- β -сигналіngu, LOX/LOXL, PLOD та TIMP [121]. Через множинність мішеней одна й та сама мікроРНК потенційно координує декілька етапів формування волокна — від транскрипції *COL1A1/COL3A1* до стабілізації та деградації фібрили. Водночас результат залежить від клітинного джерела мікроРНК, її внутрішньоклітинної локалізації, складу везикул і наявності мішеней у клітині-реципієнті. Це пояснює контекст-залежність асоціацій між експресією мікроРНК та клінічними характеристиками пухлини.

Епігенетична регуляція строми не обмежується мікроРНК. Довгі некодуючі РНК, модифікації гістонів і метилування промоторів впливають на експресію структурних білків та ферментів позаклітинного матриксу. Наприклад, linc00514 здатна підтримувати метастатичні властивості РМЗ і М2-поляризацію пухлиноасоційованих макрофагів через Jagged1/Notch-сигналінг [37]. Такі механізми поєднують епігенетичне перепрограмування стромальних та імунних клітин із формуванням пропухлинного матриксу.

На експресію генів строми впливають також механічні сигнали. Підвищення жорсткості колагенового матриксу активує інтегрини, FAK, Rho/ROCK та транскрипційні кофактори, які змінюють експресію генів цитоскелету, адгезії, колагенів і протеаз. Таким чином, виникає механогенетичний зворотний зв'язок: зміни експресії генів формують жорсткіший матрикс, а жорсткий матрикс підтримує транскрипційний профіль активованих фібробластів і інвазивних пухлинних клітин. Цей зв'язок є принциповим для розуміння того, чому морфометричні зміни волокон можуть бути стійкими та прогресувати навіть за незмінного загального вмісту колагену.

Клінічне використання мікроРНК як біомаркерів при РМЗ пов'язане з їх відносною стабільністю, тканинною та клітинною специфічністю й можливістю одночасно відображати декілька сигнальних процесів. Профілі

мікроРНК уже досліджують у зв'язку з віком хворих, молекулярним підтипом, агресивністю пухлини та станом мікрооточення [126]. Однак для підвищення біологічної інтерпретованості такі профілі доцільно зіставляти з експресією валідованих генів-мішеней, рівнем відповідних білків і кількісними характеристиками строми.

Саме інтегративний підхід дозволяє послідовно простежити шлях від регуляторної молекули до тканинного фенотипу. Зміна експресії мікроРНК може модифікувати рівні COL1A1, COL3A1, MMP, TIMP або LOX; це впливає на синтез, деградацію та крослінкінг колагену; результатом стають зміни довжини, ширини, прямолінійності та орієнтації волокон; останні, зі свого боку, визначають механотрансдукцію, інвазію, метастазування й чутливість до терапії. Водночас зворотні сигнали від жорсткого матриксу та клітин мікрооточення здатні повторно змінювати транскрипційний та мікроРНК-профіль пухлини.

Наявні дані підтверджують перспективність поєданого дослідження генів структурних колагенів, білків ремоделювання, мікроРНК і морфометричних параметрів строми. Проте залишаються невизначеними причинно-наслідкові зв'язки між окремими молекулярними змінами та конкретними характеристиками волокон, залежність цих взаємодій від віку пацієнток, молекулярного підтипу РМЗ і метастатичного статусу. Недостатньо з'ясовано також, які поєднання молекулярних і морфометричних показників мають найбільшу діагностичну та прогностичну цінність.

Отже, генетичні та епігенетичні механізми не лише контролюють об'єм структурних елементів матриксу, а й формують просторову архітектуру пухлинної строми шляхом скоординованої регуляції синтезу, фібрилогенезу, зшивання та протеолізу колагену. МікроРНК займають центральне місце у цій мережі, оскільки одночасно модулюють поведінку пухлинних, стромальних та імунних клітин і забезпечують міжклітинну

передачу регуляторних сигналів. Комплексне зіставлення експресії COL1A1, COL3A1, MMP, TIMP, LOX та мікроРНК із морфометричними параметрами волокон і клініко-патологічними характеристиками може сформувати підґрунтя для розробки нових діагностичних і прогностичних моделей перебігу РМЗ.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Клініко-патологічні характеристики хворих на рак молочної залози

Роботу виконано з використанням клінічних даних та операційного матеріалу 155 жінок, які перебували на стаціонарному лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі впродовж 2013–2016 рр. Усі пацієнтки надали інформовану згоду на використання клінічної інформації та біологічного матеріалу з науковою метою. Основну клінічну когорту становили 120 хворих на рак молочної залози (РМЗ) I–II стадій. До групи порівняння увійшли 30 пацієнток із фіброаденомою молочної залози. Ще у п'яти жінок, прооперованих з приводу фіброаденоми, досліджували тканину країв резекції, у якій під час патоморфологічної оцінки не було виявлено трансформованих клітин; ці зразки використовували як умовно незмінену тканину молочної залози.

Діагноз встановлювали на підставі результатів клінічного, інструментального та патоморфологічного обстеження. Обсяг діагностичних процедур включав загально-клінічні та біохімічні дослідження, ультразвукове дослідження органів черевної порожнини, мамографію, рентгенологічне обстеження органів грудної клітки та пункційну біопсію новоутворення молочної залози. Поширеність пухлинного процесу визначали за системою TNM відповідно до 6-го видання 2002 р. або 7-го видання 2009 р. з урахуванням періоду встановлення діагнозу. Клінічне обстеження і лікування здійснювали відповідно до чинних на момент госпіталізації стандартів, 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.

Клініко-патологічну структуру основної когорти хворих на РМЗ наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1.

Клінічна характеристика хворих на РМЗ

Показник	Кількість хворих	
	N	%
Загальна кількість хворих	120	100
Вік хворих (роки)		
Середній	53,5±11,6	
Коливання віку	34-92	
Стадія пухлинного процесу		
I	48	40,0
II	72	60,0
Категорія N за TNM		
N0	74	61,7
N1-3	46	38,3
Гістологічний тип		
Інфільтративний протоковий рак	89	74,2
Інфільтративний дольковий рак	31	25,8
Ступінь диференціювання		
G1 (високий)	16	13,3
G2 (помірний)	79	65,8
G3 (низький)	25	20,8
Молекулярний підтип		
Люмінальний А	31	25,8
Люмінальний Б	57	47,5
Her2/neu-позитивний	14	11,7
Базальний	18	15,0

Середній вік пацієнток основної когорти становив 53,5±11,6 років у діапазоні 34–92 років. У структурі вибірки переважали хворі з II стадією РМЗ — 72 (60,0%), тоді як I стадію діагностовано у 48 (40,0%) пацієнток. У 74

(61,7%) випадках метастатичне ураження регіонарних лімфатичних вузлів було відсутнім, а 46 (38,3%) пухлин належали до категорій N1–3. Більшість новоутворень становили інвазивні протокові карциноми — 89 (74,2%); інвазивну долькову карциному виявлено у 31 (25,8%) хворої.

За ступенем диференціювання найбільшою була група помірно диференційованого РМЗ G2 — 79 (65,8%) випадків. Низькодиференційовані пухлини G3 становили 20,8%, а високодиференційовані G1 — 13,3%. У молекулярній структурі вибірки переважав люмінальний В-підтип — 57 (47,5%) випадків. Частота люмінального А-підтипу становила 25,8%, базального/потрійно-негативного — 15,0%, тоді як HER2/неу-позитивного — 11,7%. Отже, основна когорта включала пухлини різного гістологічного типу, ступеня диференціювання і молекулярного підтипу та була придатною для зіставлення молекулярних і морфометричних показників із базовими клініко-патологічними характеристиками РМЗ.

Хворим основної когорти не проводили неоад'ювантної терапії. Обсяг хірургічного втручання визначали індивідуально; виконували квадрантектомію або лампектомію з регіонарною лімфодисекцією чи радикальну мастектомію за Мадденом. Після операції за клінічними показаннями призначали 4–6 курсів поліхіміотерапії за схемами CMF (циклофосфамід, метотрексат, флуороурацил) або CAF (циклофосфамід, доксорубіцин, флуороурацил). Променеву терапію проводили на ділянку післяопераційного рубця та зони регіонарного метастазування у сумарній дозі 42–44 Гр. За наявності експресії рецепторів стероїдних гормонів застосовували ад'ювантну ендокринну терапію тамоксифеном або інгібіторами ароматази відповідно до індивідуальних клінічних показань.

Для окремого аналізу перебудови колагенової матриці за умов поширеного пухлинного процесу сформовано додаткову когорту з 42 хворих на РМЗ II–IV стадій, для яких були доступні архівний матеріал первинної пухлини та клінічна інформація щодо регіонарного і/або віддаленого метастазування. У частини N-позитивних пацієнток без віддалених

метастазів додатково досліджували тканину метастатично ураженого лімфатичного вузла.

Виділення цієї когорти в окрему аналітичну групу було зумовлене двома обставинами. По-перше, її формували з іншою дослідницькою метою — для оцінки морфометричних змін колагену при регіонарній та віддаленій дисемінації, а не для загальної характеристики РМЗ I–II стадій. По-друге, доступність якісного архівного матеріалу метастатичних вогнищ і парних зразків «первинна пухлина — метастатично уражений лімфатичний вузол» була обмеженою, крім того, повна клінічна інформація стосовно таких пацієнтів також була відсутньою. Тому підбір випадків визначався наявністю придатного гістологічного матеріалу та повних клінічних даних. Об'єднання цієї вибірки з основною когортою могло б змістити її клінічну структуру у бік поширених стадій і ускладнити інтерпретацію результатів. Відповідно, додаткову когорту використовували як спеціалізовану вибірку для аналізу стромальних ознак метастатичного прогресування.

Середній вік пацієнток додаткової когорти становив $57,8 \pm 6,3$ року, діапазон — 28–86 років. Половину вибірки формували пухлини категорії T2 — 21 (50,0%) випадок. Частка T3–T4 новоутворень сукупно дорівнювала 38,1%, тоді як T1 виявлено у 11,9% хворих. Метастатичне ураження регіонарних лімфатичних вузлів встановлено у 27 (64,3%) пацієнток, а віддалені метастази — у 18 (42,9%). Отже, ця когорта була збагачена випадками з ознаками поширеного пухлинного процесу, що відповідало меті її формування.

За ступенем диференціювання переважали пухлини G2 — 24 (57,1%), тоді як частки G1 і G3 становили по 21,4%. Найпоширенішим молекулярним підтипом був люмінальний B — 35,7%; потрійно-негативні пухлини становили 28,6%, HER2/neu-позитивні — 21,4%, люмінальні A — 14,3%. Порівняно з основною когортою додаткова група мала більшу частку потрійно-негативних і HER2/neu-позитивних новоутворень, що додатково відображало її спрямованість на дослідження агресивних та метастатичних

форм РМЗ. Водночас через цільовий принцип добору її не використовували для оцінки популяційної частоти клінічних варіантів захворювання.

Таблиця 2.2.

**Клініко-патологічна характеристика хворих із регіонарним та/або
віддаленим метастазуванням РМЗ**

Показник	Кількість хворих	
	N	%
Загальна кількість хворих	42	100
Вік хворих (роки)		
Середній	57,8±6,3	
Коливання віку	28-86	
Категорія T за TNM		
T1	5	11,9
T2	21	50,0
T3	9	21,4
T4	7	16,7
Категорія N за TNM		
N0	15	35,7
N1	27	64,3
Категорія M за TNM		
M0	24	57,1
M1	18	42,9
Ступінь диференціювання		
G1 (високий)	9	21,4
G2 (помірний)	24	57,1
G3 (низький)	9	21,4
Молекулярний підтип		
Люмінальний А	6	14,3
Люмінальний Б	15	35,7
HER2/neu-positive	9	21,4
TNBC	12	28,6

Примітка. Відсотки обчислено від загальної кількості хворих додаткової когорти (n=42). Категорії N і M характеризують різні компоненти поширеності процесу та можуть поєднуватися в однієї пацієнтки.

2.2. Алгоритм оцінки морфометричних параметрів просторової організації колагенової матриці

Операційний і біопсійний матеріал після вилучення фіксували протягом 24 год за кімнатної температури у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну. Після фіксації зразки промивали проточною водою впродовж 1 год, послідовно зневоднювали у 50%, 70% і 80% етиловому спирті та у двох порціях 96% етанолу. Після целоїдин-парафінової гістологічної проводки матеріал заливали у парафін із додаванням 5% натурального воску.

Із парафінових блоків виготовляли серійні зрізи завтовшки 5 мкм. Для порівняльної візуалізації волокнистого компоненту позаклітинного матриксу (ПКМ) застосовували три трихромні гістохімічні методи: забарвлення за ван Гізоном, Массоном і Маллорі. Використовували набори Van Gieson trichrome, Masson trichrome та Mallory trichrome виробництва DiaPath (Італія); процедури виконували відповідно до інструкцій виробника. Для подальшого цифрового аналізу використовували препарати, забарвлені за Маллорі, оскільки цей метод забезпечував найбільш виразне контрастування колагенових волокон відносно інших тканинних компонентів.

Цифрові зображення отримували за допомогою мікроскопа Axio Scope A1, оснащеного камерою AxioCam ICc5 (Carl Zeiss, Німеччина), при загальному збільшенні $\times 260$. Параметри освітлення та збільшення зберігали незмінними в межах серії досліджень. Попередню підготовку мікрофотографій здійснювали в Adobe Photoshop CC (Adobe Systems Inc., США): виконували стандартизоване перетворення зображень, необхідне для відокремлення волокнистого компонента та подальшої сегментації.

Площу пухлинної паренхіми і стромы визначали у програмі ImageJ (National Institutes of Health, США), після чого розраховували пухлинно-стромальне співвідношення (tumour–stroma ratio, TSR). Просторові характеристики окремих колагенових волокон оцінювали у CurveAlign v. 4.0

beta із застосуванням модулів СТ та СТ-FIRE. Для кожного зображення визначали ширину, довжину, коефіцієнт прямолінійності, кут орієнтації та щільність колагенових волокон. Одержані кількісні показники зіставляли з категоріями T, N і M, ступенем диференціювання, гістологічним та молекулярним підтипами РМЗ, а також із рівнями експресії досліджуваних молекулярних маркерів.

2.3. Біоінформатичний аналіз

Пошук мікроРНК, потенційно залучених до регуляції стромального компоненту РМЗ, здійснювали шляхом інтегрованого аналізу загальнодоступних наборів даних Gene Expression Omnibus (GEO; National Center for Biotechnology Information). До первинного аналізу включали набори, що містили профілі мікроРНК у пухлинній та нормальній тканині молочної залози або у виділеному стромальному компоненті.

Набір GSE37963 містив дані щодо 677 мікроРНК у 52 зразках РМЗ та 4 зразках нормальної тканини молочної залози. GSE154255 включав профілі 2006 мікроРНК у 10 пухлинах різних молекулярних підтипів і в попарно відібраній умовно нормальній тканині тих самих пацієнток. У GSE45666 були представлені дані щодо 866 мікроРНК людини та 89 вірусних мікроРНК, визначених у 101 зразку пухлинної та 15 зразках нормальної тканини молочної залози. Набір GSE26659 охоплював 77 зразків РМЗ і 17 зразків тканини молочної залози, отриманих під час мамопластики в умовно здорових жінок, та містив дані щодо 723 мікроРНК людини і 76 вірусних мікроРНК.

Для визначення диференційно експресованих генів строми додатково використано GSE26910, до якого входили по 6 зразків строми РМЗ та умовно нормальної молочної залози; GSE10797, що містив 28 зразків пухлинної та 5

зразків нормальної строми; GSE14548 із 14 попарно зіставленими зразками пухлинної й умовно нормальної строми.

Первинне порівняння експресії виконували за допомогою GEO2R. Для контролю множинних порівнянь застосовували поправку Benjamini–Hochberg із контролем false discovery rate. МікроРНК або гени вважали диференційно експресованими за абсолютного значення $\log_2FC \geq 1$ та скоригованого значення $\text{adj.}P < 0,05$. Результати кожного порівняння візуалізували у вигляді volcano plot, після чого визначали спільні зміни між незалежними наборами даних.

Функціональне збагачення для відібраних мікроРНК аналізували у DIANA miRPath v.3.0 із використанням експериментально верифікованих взаємодій із TarBase v7.0. Статистичну значущість збагачення оцінювали за точним критерієм Фішера з подальшою FDR-корекцією; пороговим вважали скориговане $p < 0,05$. Взаємозв'язки між мікроРНК і сигнальними шляхами KEGG відображали за допомогою ієрархічної кластеризації та теплових карт, сформованих у DIANA miRPath.

Експериментально підтверджені гени-мішені ідентифікували за допомогою miRTarBase, release 2025. Подальший аналіз переліку генів проводили у ShinyGO v.0.82. Для оцінки сигнальних шляхів використовували KEGG і NetPath, для функціональної анотації — категорії Gene Ontology: Biological Process, Molecular Function і Cellular Component. Результати KEGG представляли у вигляді lollipop plot, де довжина маркера характеризувала ступінь збагачення, а колір — статистичну значущість. Результати GO-аналізу візуалізували за допомогою bubble plot, у якому розмір кола відповідав кількості генів у функціональній категорії. Клітинну специфічність генів-мішеней оцінювали за колекцією Co.Expression.Azimuth.Cell.Types.2021 (Azimuth/HuBMAP).

Залежність експресії мРНК і мікроРНК від клініко-патологічних характеристик РМЗ додатково досліджували за допомогою UALCAN (The University of Alabama at Birmingham CANcer data analysis Portal), що інтерпuye

дані The Cancer Genome Atlas. Результати аналізу публічних баз даних використовували для пріоритизації маркерів, які надалі верифікували на власному клінічному матеріалі.

2.4. Імуногістохімічне дослідження білків ремоделювання позаклітинного матриксу

Імуногістохімічне дослідження проводили на зрізах операційного та біопсійного матеріалу завтовшки 5–7 мкм, виготовлених із парафінових блоків. Зрізи депарафінізували в ортоксилолі протягом 20 хв, переносили у 96% етанол на 20 хв і двічі промивали дистильованою водою по 3 хв. Для демаскування антигенів препарати інкубували в EDTA-буфері з рН 8,0 на водяній бані WB-4MS (Biosan, Латвія) при 95 °C упродовж 20 хв, після чого охолоджували до кімнатної температури.

Візуалізацію імунної реакції здійснювали за допомогою полімерної системи Lab Vision UltraVision Quanto Detection System (Thermo Scientific, США). Перелік її основних компонентів наведено в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3.

Реагенти системи візуалізації Lab Vision UltraVision Quanto Detection System

№	Реагент	Об'єм
1	UltraVision Hydrogen Peroxide Block	15 мл
2	Primary Antibody Enhancer	15 мл
3	HRP Polymer	15 мл
4	DAB Quanto Substrate	15 мл
5	DAB Quanto Chromogen	1 мл

Після демаскування зрізи тричі промивали дистильованою водою протягом 2 хв. Активність ендогенної пероксидази блокували реагентом Hydrogen Peroxidase Block протягом 10 хв за кімнатної температури. Після

кожного основного етапу препарати промивали у трьох порціях фосфатно-сольового буфера PBS (pH 7,4) по 5 хв, не допускаючи висихання тканинного зрізу.

Первинні антитіла наносили у попередньо оптимізованому розведенні та інкубували протягом 60 хв у вологій камері. Після відмивання наносили Primary Antibody Enhancer на 10 хв, а потім — HRP Polymer також на 10 хв за кімнатної температури. Комплекси антиген–антитіло візуалізували за допомогою 3,3'-діамінобензидину тетрагідрохлориду; позитивна реакція проявлялася коричневим забарвленням. Ядра клітин контрастували гематоксиліном Майєра (Thermo Scientific, США). Характеристики первинних антитіл наведено в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4.

Первинні антитіла, використані для дослідження тканини РМЗ

Маркер	Клон	Робоче розведення	Виробник
COL1A1	1B2	1:400	MyBioSource
COL3A1	5G2	1:350	MyBioSource
MMP1	GA5	1:300	Invitrogen
MMP8	MA5-41639	1:200	Invitrogen
TIMP3	PSH04-41	1:100	Invitrogen
LOX	поліклональні	1:250	Merck Millipore

Специфічність забарвлення контролювали під час кожної серії реакцій. Позитивним контролем слугували зрізи тканин із попередньо підтвердженою експресією відповідного маркера. Для негативного контролю використовували зрізи РМЗ, на які замість первинного антитіла наносили буферний розчин.

Препарати аналізували за допомогою світлового мікроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Німеччина) при збільшенні $\times 100$ – 400 . Для кожного зразка оцінювали 20 полів зору. Інтенсивність і поширеність імуногістохімічної реакції для MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX визначали за системою H-score:

$$\text{H-score} = 0 \times N_0 + 1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times N_3,$$

де N0, N1, N2 і N3 — частки клітин, відповідно, без забарвлення та зі слабкою, помірною і вираженою інтенсивністю реакції. Значення H-score могло змінюватися від 0 до 300 балів; 0–100 балів відповідали низькому, 101–200 — помірному, 201–300 — високому рівню експресії.

Експресію COL1A1 і COL3A1 у волокнистому компоненті строми додатково кількісно оцінювали за допомогою плагіна IHC Profiler для ImageJ. Для кожного гістологічного зразка фотографували щонайменше 10 репрезентативних полів зору за однакових умов освітлення та збільшення.

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

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

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

Індекс оптичної щільності

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

Програма здатна повністю автономно аналізувати мікрофотографії та видавати результати інтенсивності експресії.

2.5. Визначення експресії мікроРНК, та мРНК методом RT-qPCR

Експресію miR-26b-5p, miR-100-5p, miR-142-3p і miR-143-3p визначали методом зворотнотранскрипційної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі. Джерелом РНК були парафінові блоки пухлинної тканини хворих на РМЗ.

Тотальну РНК із фіксованої формаліном та залитої парафіном тканини виділяли за допомогою RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Німеччина) відповідно до протоколу виробника. Концентрацію РНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США), а її чистоту оцінювали за співвідношенням оптичного поглинання A260/A280. Отриману РНК розчиняли у Tris-EDTA-буфері та зберігали при -20°C до проведення зворотної транскрипції.

Для синтезу кДНК застосовували модифікований протокол stem-loop RT-qPCR: для кожної мікроРНК використовували специфічний stem-loop праймер, а під час ампліфікації — універсальний зворотний праймер 5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'. Склад реакційної суміші для зворотної транскрипції наведено в таблиці 2.5.

Послідовності праймерів проектували за допомогою miRNA primer design tool (<http://genomics.dote.hu:8080/mirnadesigntool/>), синтез здійснювала компанія Metabion (Німеччина). Послідовності прямих праймерів наведено у напрямку 5'→3' у таблиці 2.6.

Таблиця 2.5.

Склад реакційної суміші для зворотної транскрипції

Компонент	Об'єм на реакцію 5 мкл, мкл
Суміш дезоксинуклеотидів, 100 мМ	0,05
Зворотна транскриптаза MultiScribe, 50 U/мкл	0,33
Буфер для зворотної транскрипції, 10×	0,50
Інгібітор РНКаз	0,06
Вода, вільна від нуклеаз	1,56
Праймер для мікроРНК, 5×	1,00
Зразок тотальної РНК	1,50
Загальний об'єм	5,00

Таблиця 2.6.

Послідовності прямих праймерів для визначення мікроРНК

мікроРНК	Послідовність праймера, 5'→3'
miR-26b-5p	GTTTGGGTTCAAGTAATTCAGG
miR-100-5p	GTGAACCCGTAAGATCCGAA
miR-142-3p	TGGGTGTGTAGTGTTCCTACTT
miR-143-3p	GGGTGAGATGAAGCACTGTA

Кількісну ПЛР проводили з використанням Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) (Thermo Scientific, США) на ампліфікаторі Applied Biosystems 7500. Склад реакційної суміші наведено у таблиці 2.7, температурний профіль — у таблиці 2.8. Усі реакції виконували у трьох технічних повторях.

Таблиця 2.7.

Склад реакційної суміші для кількісної ПЛР

Компонент	Об'єм на реакцію 20 мкл, мкл
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, 2×	10,00
Вода, вільна від нуклеаз	4,00
Суміш прямого та зворотного праймерів, 20×	1,00
кДНК	5,00
Загальний об'єм	20,00

Таблиця 2.8.

Температурний режим кількісної ПЛР

Параметр	Початкова активація	Денатурація	Подовження ланцюга
Кількість циклів	1	40	40
Час	10 хв	15 с	60 с
Температура, °C	95	95	60

Ендогенним контролем слугувала RNU48. Для неї використовували RT-праймер 5'-CTCTGACC-3', прямий праймер 5'-AGTGATGATGACCCCAGGTAAC TC-3' і зворотний праймер 5'-CTGCGGTGATGGCATCAG-3', синтезовані компанією Metabion.

Послідовності праймерів для виявлення мРНК гену *COL1A1* (Forward: GATTCCTGGACCTAAAGGTGC; Reverse: AGCCTCTCCATCTTTGCCAGCA) були взяті з ресурсу OriGene (https://www.origene.com/catalog?oti_sub_category=18067) та синтезовані компанією YP Biotech, Україна. В вигляді внутрішнього контролю використовували ген *ACTB* (Forward: CACTTTCTACAATGAGCTGCG; Reverse: CTGGATGGCTACGTACATGG).

Середнє значення порогового циклу C_t , отримане у триплікатах, нормалізували відносно C_t ендогенного контролю. Відносний рівень експресії розраховували як $2^{-\Delta C_t}$, де $\Delta C_t = C_t(\text{мікроРНК}) - C_t(\text{RNU48})$. Зміну експресії відносно групи-калібратора визначали за формулою $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Первинне опрацювання C_t -значень і розрахунок відносної експресії здійснювали у Microsoft Excel.

2.6. Методи статистичного аналізу даних

Статистичне опрацювання результатів проводили у GraphPad Prism v.8.0 (GraphPad Software Inc., США) та STATISTICA v.12.0 (StatSoft, США).

Структуру клінічних когорт описували абсолютними значеннями і частками у відсотках. Кількісні показники представляли як середнє зі стандартним відхиленням або непараметричними характеристиками відповідно до типу розподілу.

Для порівняння двох незалежних груп за параметричного розподілу застосовували t-критерій Стюдента, за непараметричного — U-критерій Манна–Уїтні. Взаємозв'язки між рівнями експресії молекулярних маркерів, морфометричними параметрами колагенових волокон і клініко-патологічними характеристиками оцінювали за коефіцієнтом рангової кореляції Спірмена r .

Для оцінювання незалежного внеску морфометричних показників у варіабельність категорій T, N і ступеня диференціювання будували множинні регресійні моделі з включенням ширини, довжини, прямолінійності та щільності колагенових волокон і TSR. Моделі характеризували за R^2 , а внесок предикторів — за стандартизованими β та p -значеннями. Критерієм статистичної значущості було $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. МОРФОМЕТРИЧНІ ОЗНАКИ ДЕЗОРГАНІЗАЦІЇ КОЛАГЕНУ ЯК ІНФОРМАТИВНІ АТРИБУТИ, АСОЦІЙОВАНІ З ПЕРЕБІГОМ РМЗ

3.1. Розробка алгоритму оцінки просторової організації колагенової матриці у тканині раку молочної залози

На першому етапі роботи здійснено підбір найбільш коректного методу гістохімічного фарбування для морфометричного аналізу колагену у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози (рис.3.1–3.3). Отримані результати візуального дослідження мікропрепаратів новоутворень молочної залози свідчать про пріоритетність використання методу зафарбування зразків за Маллорі, порівняно з методиками за ван Гізоном та Масоном (рис.3.1.). Доведено, що обраний підхід забезпечує найбільш високий рівень селективного контрастного забарвлення саме екстрацелюлярних колагенових волокон в складі пухлин молочної залози.

Для отримання гістологічних препаратів із парафінових блоків зразків РМЗ проводили виготовлення серійних зрізів завтовшки 5 мкм. Надалі тканину забарвлювали гістохімічним методом за Маллорі. Цей тип забарвлення застосовується для вивчення волокнистих структур сполучної тканини. Метод ґрунтується на унікальній властивості анілінового синього фарбувати колагенові волокна в зеленувато-синій колір, а кислотного фуксину — еластичні волокна в червоний. У результаті такого забарвлення колагенові волокна набувають темно-синього кольору, ядра, еластичні волокна — червоного, амілоїд та гіалін — блакитного, м'язова тканина — оранжевого, нейроглія — червоно-фіолетового, а еритроцити — жовтого. З огляду на специфіку морфологічної структури пухлинної тканини, метод дозволяє з високою ефективністю відокремлювати волокнистий колагеновий

компонент новоутворення від інших елементів тканини, що надалі було використано для сегрегації волокнистих елементів на зображеннях.

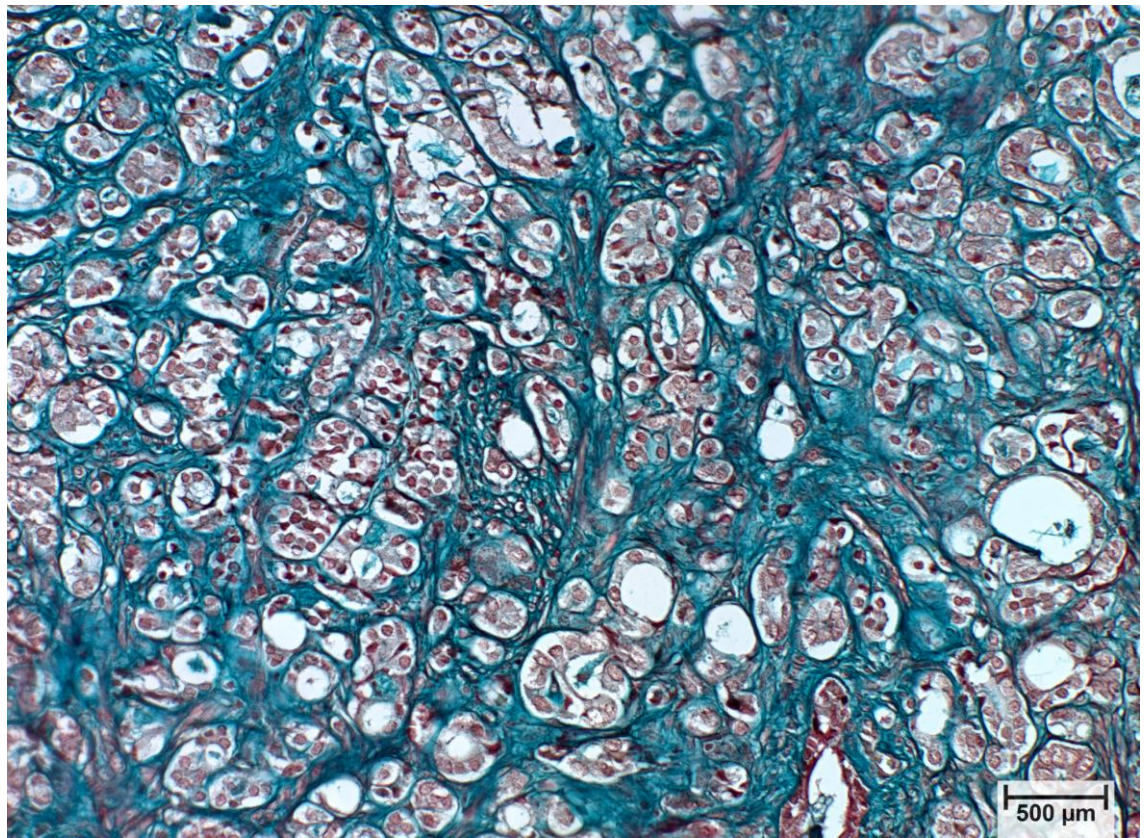


Рис.3.1. Гістохімічне зафарбування тканини РМЗ за Масоном, $\times 200$.

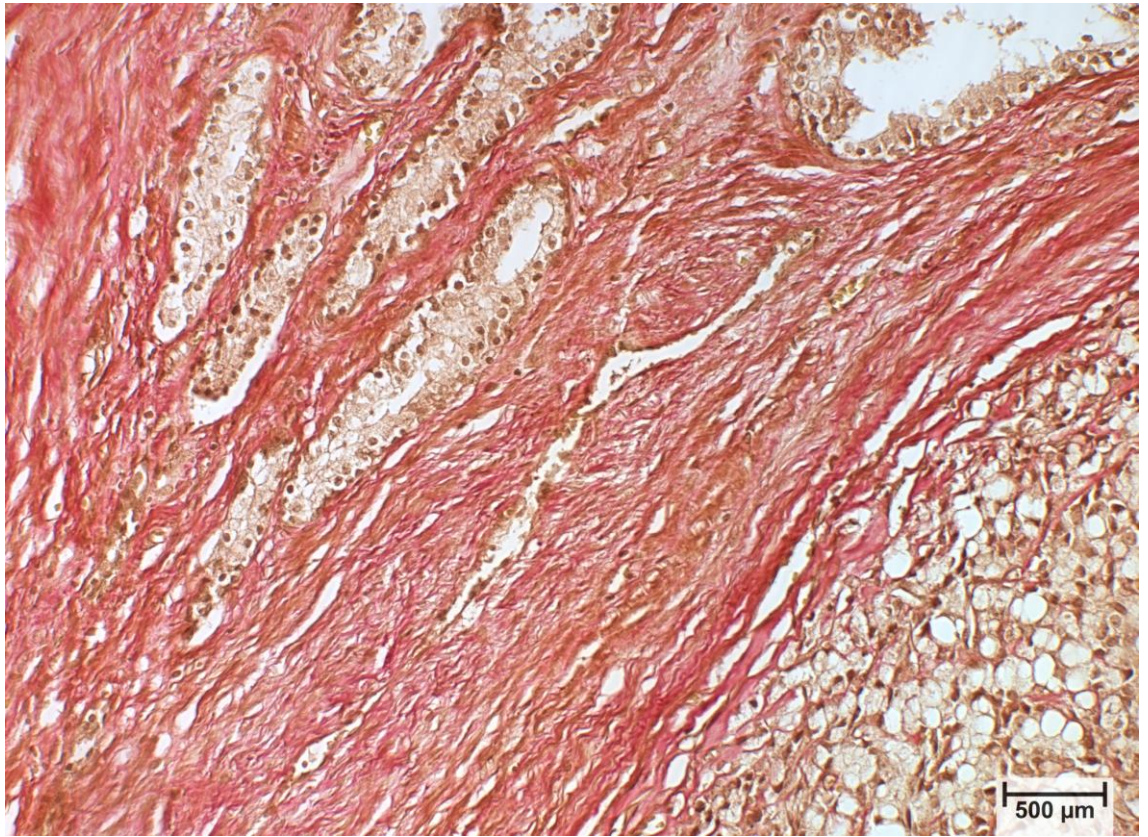


Рис.3.2. Гістохімічне зафарбування тканини РМЗ за ван Гізоном, $\times 200$.

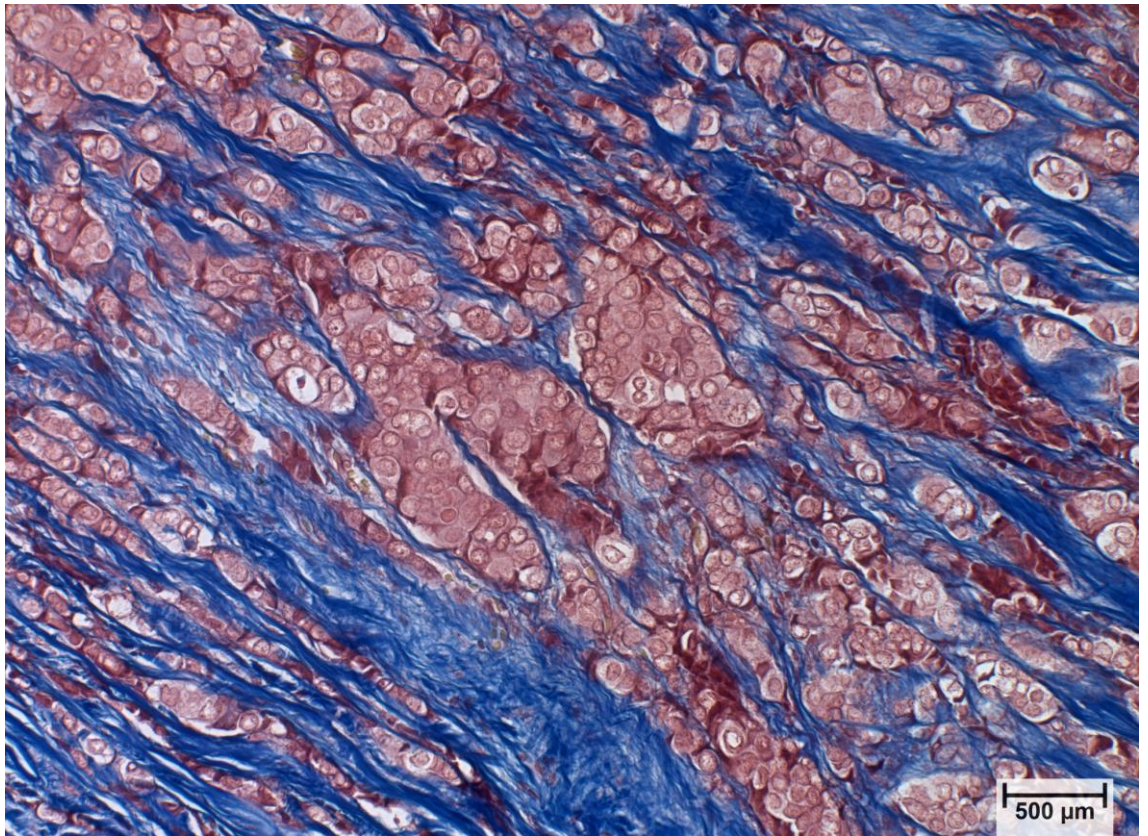


Рис.3.3. Гістохімічне зафарбування тканини РМЗ за Маллорі (В), $\times 200$.

Як було зазначено раніше, для отримання якісної експертної оцінки щодо ступеня злоякісності РМЗ необхідним є поєднання візуальної оцінки та визначення кількісних ознак шляхом цифрового морфометричного аналізу, для виконання якого використовують системи автоматизованої мікроскопії, до складу якої, поруч з мікроскопом і цифровою камерою, входить спеціалізоване програмне забезпечення. За допомогою таких систем опрацювання біомедичних зображень проводяться сегментація, контурний аналіз, текстурний аналіз, детекція та класифікація об'єктів на мікрофото. Мікрофотографії препаратів отримували за допомогою цифрового мікроскопічного комплексу AxioScope A1 (Carl Zeiss, Німеччина) та камери AxioCam ICc5 (Carl Zeiss, Німеччина) з кратністю збільшення $\times 260$. Усі мікрофотографії зберігалися у форматі *jpeg*. Розмір зображення становив 2452×2056 пікселів.

Ключовим елементом розробленого алгоритму була обробка мікрофотографій у графічному редакторі Adobe Photoshop CC (рис.3.4), який використовувався для відокремлення елементів колагенового каркасу, забарвлених у темно-синій, та інших компонентів пухлинної тканини, забарвлених у червоний і жовтий кольори. За допомогою алгоритму «розумного» вибору об'єктів інструментом «Magic Wand», який виділяє пікселі за тоном і кольором, відокремлювали волокнистий каркас пухлини. У параметрах інструмента було обрано оптимальне значення толерантності — відхилення тону пікселя від заданого еталонного значення на мікрофотографії.

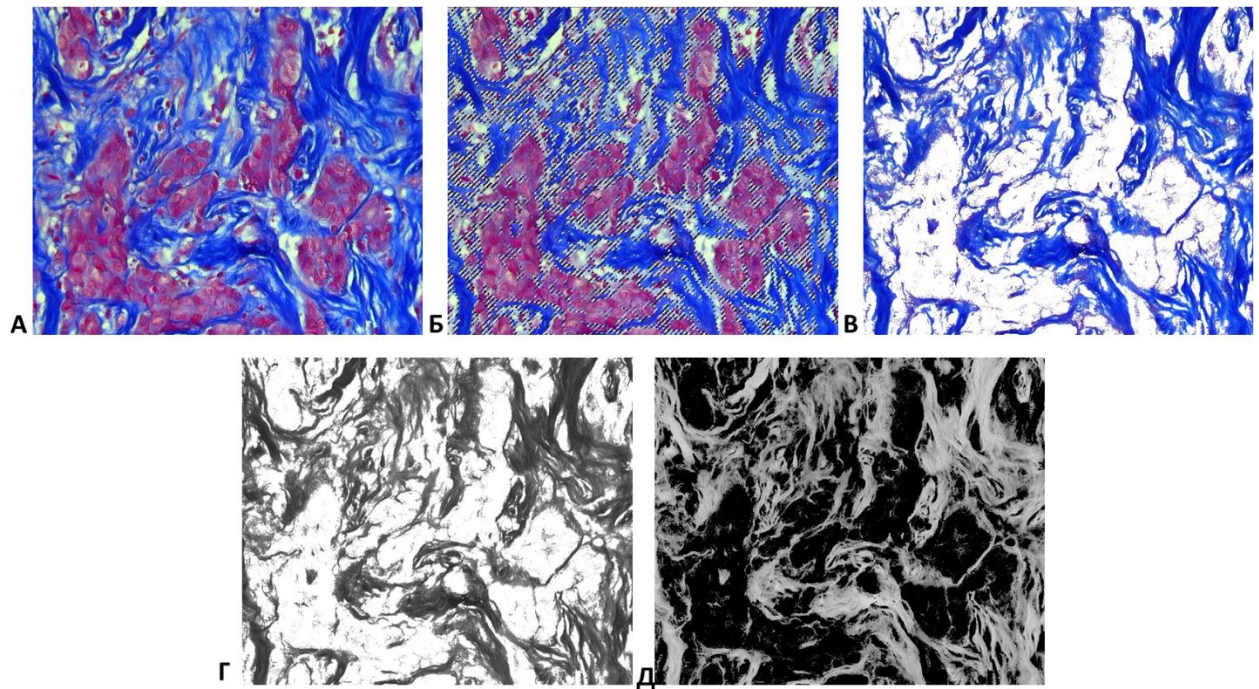


Рис.3.4. Алгоритм редагування зображень у Adobe Photoshop: А – вихідне зображення без обробки; Б – виділення стромы інструментом Magic Wand; В – відокремлений стромальний компонент; Г – чорно-біла монохромна маска; Д – інвертована чорно-біла монохромна маска.

Після вибору ділянки мікрофотографії з неклітинним стромальним компонентом її вирізали на новий шар із білим фоном. Далі отримане зображення переводили у монохромний режим, після чого інвертували чорно-біле зображення. Останній крок був необхідний для подальшого використання отриманих зображень у спеціалізованому алгоритмі аналізу.

Аналіз показників кількісної та просторової дезорганізації колагенових волокон у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози проводили за алгоритмом, представленим на рис.3.5, із застосуванням програми CurveAlign v. 4.0. Beta та ImageJ. Цей програмний пакет дає змогу аналізувати зображення, отримані методом SHG-мікроскопії. Запропонований нами алгоритм дозволяє використовувати програмний пакет CurveAlign для аналізу зображень, отриманих за допомогою світлової

мікроскопії, що знижує вартість і уніфікує методику дослідження волокнистих елементів різних типів пухлин.

Відомо, що найбільш широкий спектр характеристик фібрилярного компонента ПКМ можна отримати, використовуючи пакет CurveAlign. Аналіз в режимі CT-FIRE дозволяє отримати значення довжини, ширини волокон, ступінь їх прямолінійності та кут відносно просторового розміщення, а також кількість. Класичний режим СТ в свою чергу дає змогу отримати також значення вирівнювання волокон одне відносно одного. Задля розширення кількості описових числових характеристик колагенового каркасу нами також було використано ImageJ для розрахунку площі колагенової мережі, відображеної на мікрофотографії, що дозволило оцінити її щільність (рис.3.6.). Слід зазначити, що усі наведені параметри просторової організації колагену є вирішальними для якісної оцінки колагенового каркасу, що дозволяє визначити ознаки агресивності пухлинного процесу на рівні первинного пухлинного вогнища, асоційовані з інвазивною активністю та метастатичним потенціалом РМЗ.

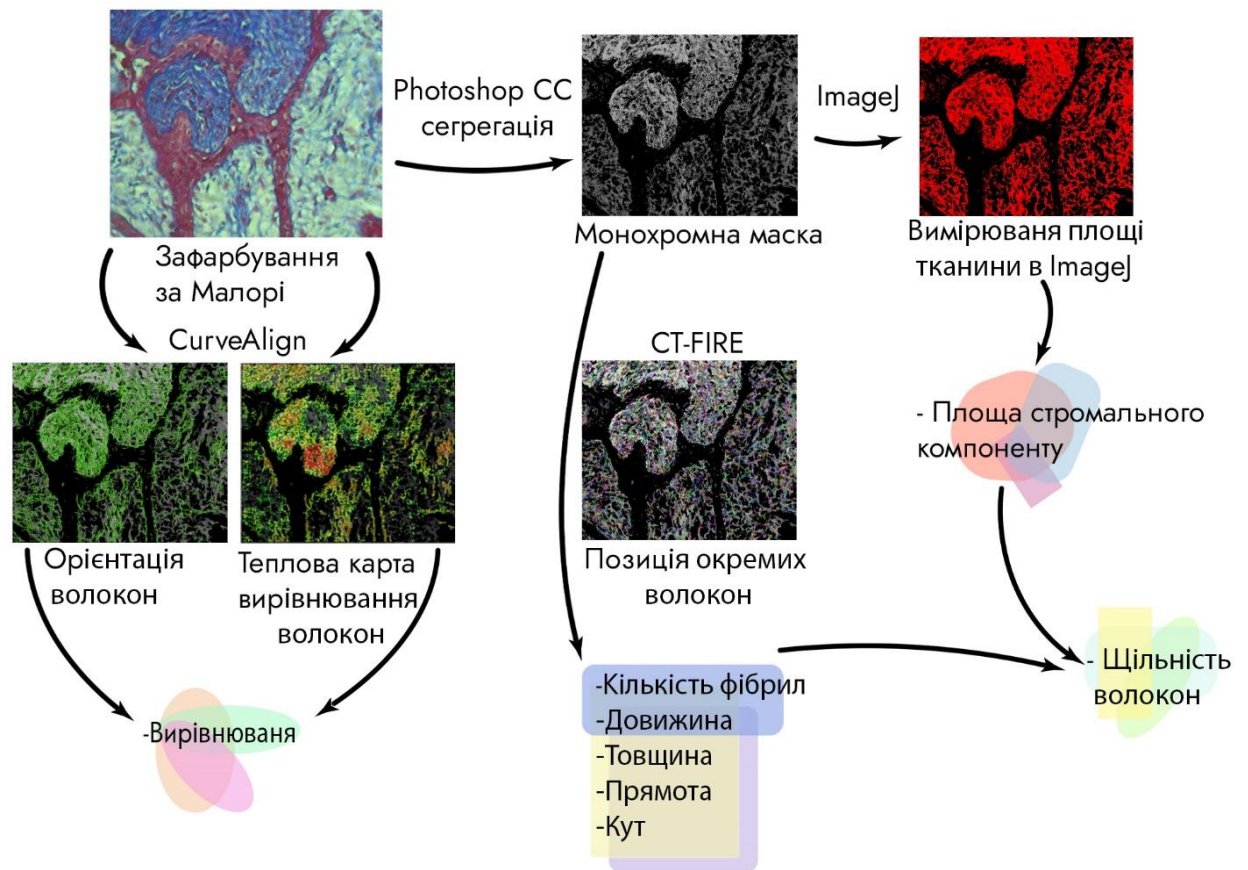


Рис.3.5. Алгоритм дослідження якісних та кількісних показників організації колагенових волокон у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози

Тому в подальшому нами було проаналізовано такі кількісні параметри колагенових волокон, як довжина та ширина кожного волокна, їх кількість у полі зору, прямолінійність, вирівнювання, а також орієнтація (Angle).

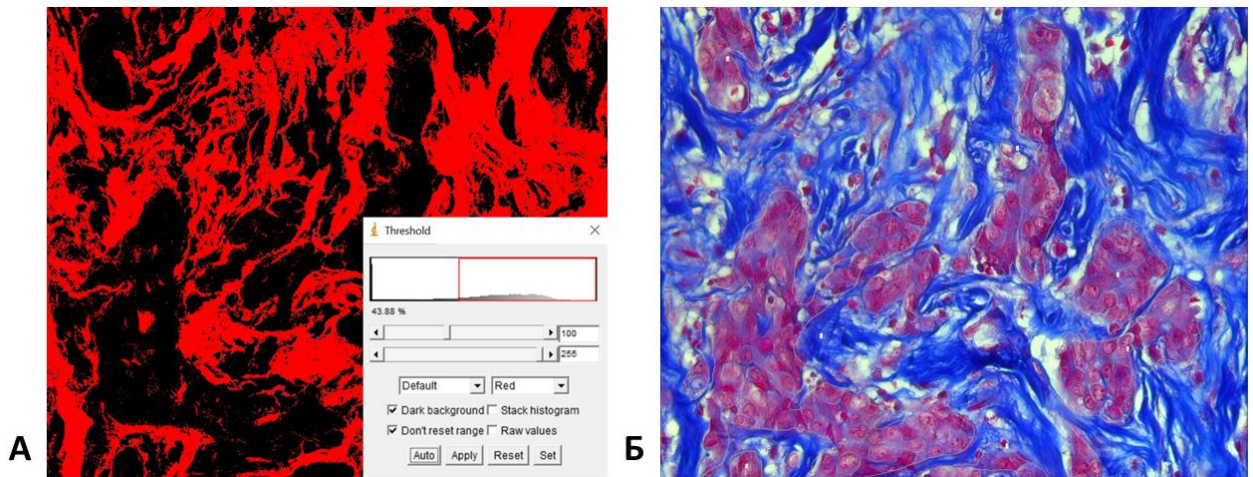


Рис.3.6. Вимірювання площі строми та пухлини в ImageJ для розрахунку TSR і щільності волокон: площа строми, виміряна за допомогою інструмента Threshold (А); площа пухлини, виміряна у класичному алгоритмі ImageJ (Б)

Окрім того, із використанням програми ImageJ нами було проведено вимірювання площ пухлинної паренхіми та строми, які в подальшому були використані для розрахунку показника пухлинно-стромального співвідношення (tumor-stroma ratio, TSR) та щільності розміщення волокон у тканині (рис.3.7). Прямолінійність (Straightness) волокон представлена у вигляді коефіцієнта в розмірі від 0 до 1, де розмір значення корелює із ступенем прямої волокон на мікрофотографії. Вирівнювання (Alignment) описує загальну тенденцію напрямку волокон одне відносно одного і також представлене в форматі коефіцієнта від 0 до 1, де максимальне значення 1 свідчить про те, що всі волокна в тканині ідеально паралельні. Що стосується показника Angle, то його значення вказує на розмір кута, який утворює кожне волокно при перетині із умовною лінією, паралельною до горизонтальних осей фотографії. Загалом, дослідження комплексу зазначених показників дозволяє ідентифікувати особливості просторового

розміщення колагенових фібрил, визначити їх орієнтацію, впорядкованість та рівень анізотропії.

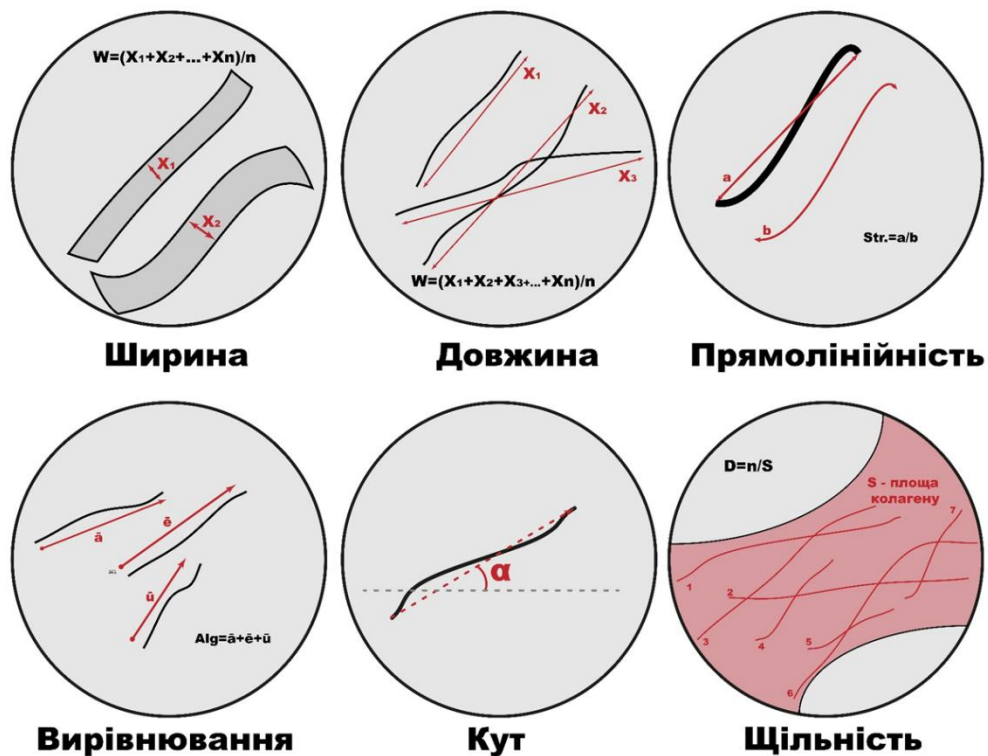


Рис.3.7. Морфометричні параметри просторової організації колагенової матриці, що вимірювалися за допомогою плагіну CT-FIRE у пакеті CurveAlign

На наступному етапі виконували обчислення та перетворення вихідних даних. Модуль CurveAlign генерує результати у вигляді коефіцієнтів або розмірів у пікселях. Для зручності оцінки отриманих показників і уніфікації одиниць вимірювання значення довжини та ширини конвертували в мікрометри. Показник TSR обчислювали шляхом ділення площі пухлинного компонента тканини на площу строми. Щільність волокон на одиницю площі визначали шляхом ділення площі строми на кількість волокон у межах мікрофотографії. Після цього всі значення морфометричних характеристик організації колагену були готові для статистичного аналізу.

Для верифікації алгоритму було використано зразки пухлинної тканини 120 пацієнтів із РМЗ та 30 хворих із фіброаденомою. Аналізуючи кількісні характеристики просторової організації колагену, досліджували параметри близько 1 400 000 індивідуальних волокон у складі пухлинної стромы. Розподіл даних наведено на рис.3.8.

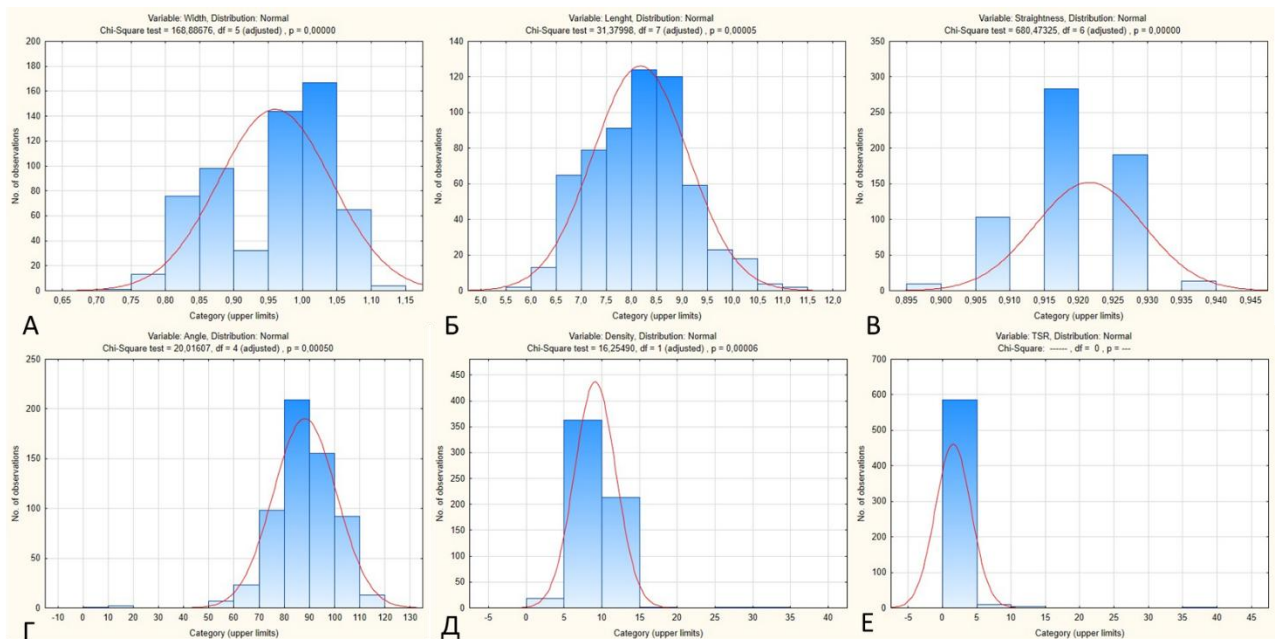


Рис.3.8. Графік розподілу даних CurveAlign: ширина (А); довжина (Б); прямолінійність (В); кут (Г); щільність (Д); TSR (Е) колагенових волокон у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози

В подальшому, використовуючи описаний вище алгоритм, нами було проведено оцінку морфометричних параметрів просторової організації колагенової матриці у пухлинній тканині доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози. Як видно з даних, наведених на рис.3.9, колагенові волокна у тканині РМЗ були більш випрямлені, ніж у фіброаденоми ($p < 0,001$). Зокрема, значення коефіцієнта Straightness у тканині РМЗ, що характеризує зазначений параметр, становило 0,92, тоді як для тканини FA цей параметр дорівнював 0,89. Достовірної різниці у показниках загального вирівнювання (Alignment) колагенових волокон у

тканині доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози не виявлено. Водночас встановлено, що показник орієнтації колагенових волокон у тканині РМЗ був достовірно вищим порівняно з тканиною FA ($p < 0,05$).

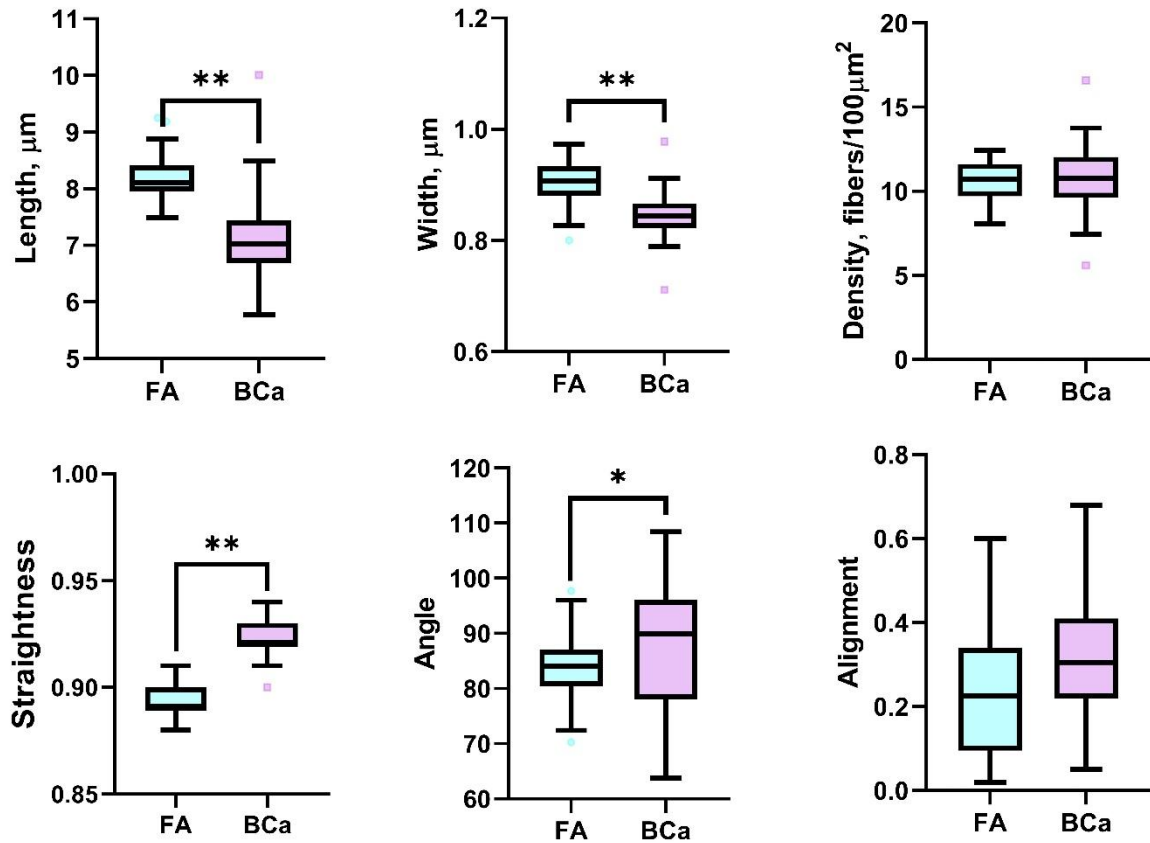


Рис.3.9. Кількісні показники просторової організації колагену у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози:

* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$.

Таким чином, колагенові волокна у тканині РМЗ характеризуються достовірно нижчими значеннями довжини ($p < 0,001$) та ширини ($p < 0,001$), а також вищими показниками прямолінійності (Straightness) ($p < 0,001$) та орієнтації ($p < 0,05$) порівняно з аналогічними показниками у тканині FA. Не виявлено достовірної різниці у щільності колагенових волокон у тканині доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози.

3.2. Морфометричний фенотип колагенової стромы залежно від клініко-патологічних характеристик РМЗ

На наступному етапі дослідження нами виконано кластерний аналіз методом k-середніх, у результаті якого всі мікрофотографії були поділені на 3 кластери залежно від комбінації морфометричних характеристик (довжина, ширина, прямолінійність, кут, щільність і TSR). Для побудови графіків середніх значень досліджуваних морфометричних параметрів у межах кожного кластера значення стандартизували за допомогою програми Statistica 12 (рис.3.10, табл.3.1).

Таблиця.3.1.

Евклідові відстані між отриманими кластерами

Евклідові відстані			
	Кластер 1	Кластер 2	Кластер 3
Кластер 1	0.000000	1.206437	0.691249
Кластер 2	1.098379	0.000000	1.475593
Кластер 3	0.831414	1.214740	0.000000

Надалі отримані кластери були проаналізовані відповідно до клінічних характеристик РМЗ, а також за морфометричними показниками просторової організації колагену. Як видно з даних, наведених у таблиці 3.2, кластер 1 включав зразки РМЗ обох досліджених категорій Т (Т1 та Т2 – відповідно 59,6% та 40,4% випадків) і N (N0 та N1 – відповідно 32,2% та 67,8%) згідно з класифікацією TNM. Другий кластер містив зразки РМЗ пацієнтів переважно з категоріями Т2 і N0 (відповідно 90% та 91,6% випадків). На відміну від цього, кластер 3 складався переважно із зразків РМЗ пацієнтів з новоутвореннями невеликого розміру (80,0%) та метастатичним ураженням

регіонарних лімфатичних вузлів (90%). Більшість зразків РМЗ у всіх досліджених кластерах мала помірний ступінь диференціювання (табл.3.2.).

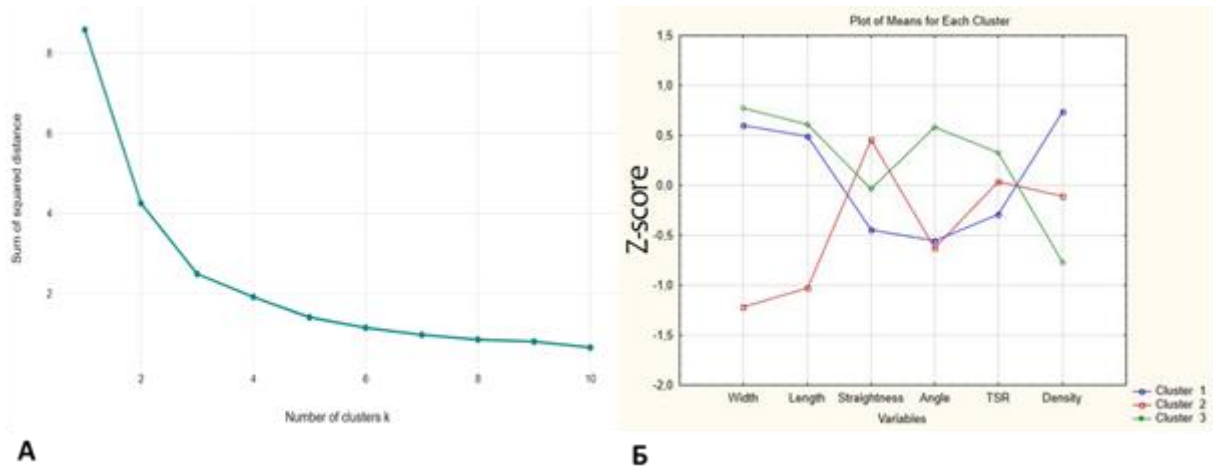


Рис.3.10. Кластерний аналіз: діаграма «лікоть» для визначення кількості кластерів (А); графік середніх значень морфометричних параметрів просторової організації колагену для окремих кластерів (Б)

Слід зазначити, що кластери 1 і 2 були представлені переважно зразками новоутворень люмінальних підтипів А та В, тоді як кластер 3 включав випадки HER2/neu-позитивного та базального молекулярного підтипів РМЗ.

При аналізі просторових характеристик колагенових волокон встановлено, що зразки кластера 1 характеризувалися найвищими показниками щільності ($10,16149 \pm 0,123968$ волокон/100 мкм²), а також низькими значеннями прямолінійності ($0,92052 \pm 0,003632$ у.о.) і TSR ($1,03380 \pm 1,451433$ у.о.) порівняно з аналогічними показниками кластерів 2 і 3 (табл.3.3.).

Таблиця. 3.2.

Клініко-патологічні характеристики РМЗ пацієток, що входили до кожного кластера

Кластер 1								
Клінічна характеристика	Розмір пухлини (T)		Метастази до л.в. (N)		Ступінь диференціювання (G)		Молекулярний підтип	
	T1	T2	N0	N1	G2	G3	LUM	BAS
%	59.6	40.4	32.2	67.8	53.9	46.1	98.26	1.74
N. мікрофото	137	93	74	156	124	106	226	4
Кластер 2								
Клінічна характеристика	Розмір пухлини (T)		Метастази до л.в. (N)		Ступінь диференціювання (G)		Молекулярний підтип	
	T1	T2	N0	N1	G2	G3	LUM	BAS
%	10	90	91.6	8.4	93.2	6.8	100	0
N. мікрофото	19	171	174	16	177	13	190	0
Кластер 3								
Клінічна характеристика	Розмір пухлини (T)		Метастази до л.в. (N)		Ступінь диференціювання (G)		Молекулярний підтип	
	T1	T2	N0	N1	G2	G3	LUM	BAS
%	80	20	90	10	78.3	21.7	7.8	91.2
N. мікрофото	144	36	162	18	141	39	14	166

Зразки РМЗ із кластера 2 мали найвищі значення прямолінійності ($0,92339 \pm 0,004933$ у.о.), а також найменші серед трьох досліджених

кластерів показники довжини ($7,94594 \pm 0,772611$ мкм), ширини ($0,93461 \pm 0,076355$ мкм) і кута ($81,17072 \pm 1,761953^\circ$) (табл.3.3.).

Характерною особливістю новоутворень РМЗ, віднесених до кластера 3, були значно більші значення довжини ($8,42019 \pm 0,798403$ мкм) та ширини волокон ($0,99823 \pm 0,061393$ мкм), кута ($92,13478 \pm 1,821311^\circ$), TSR ($1,91686 \pm 0,628126$ у.о.), а також найменша щільність волокон ($9,11197 \pm 0,502637$ волокон/100 мкм²).

Таблиця.3.3.

Кількісні показники просторової організації колагену у тканині РМЗ для кожного кластера

	Кластер 1		Кластер 2		Кластер 3	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Ширина	0.946	0.079	0.934	0.076355	0.998	0.061
Довжина	8.093	0.691	7.945	0.772611	8.420	0.798
Прямолінійність	0.921	0.0036	0.923	0.004933	0.922	0.005
Кут	86.468	1.549	81.171	1.761953	92.135	1.821
TSR	1.034	0.451	1.363	0.628126	1.917	0.791
Щільність	10.161	0.124	9.309	0.837603	9.112	0.503

При аналізі взаємозв'язку між морфометричними параметрами колагенових волокон у тканині РМЗ та клініко-патологічними особливостями пухлинного процесу (рис. 3.11-3.13) встановлено значне зменшення довжини волокон зі збільшенням розміру пухлини (Т) ($p = 0,0006$) та зниженням ступеня диференціювання пухлини ($p < 0,0001$), а також наявністю метастатичних уражень у регіональних лімфатичних вузлах (N) ($p < 0,0001$). Подібні зміни спостерігалися і при вивченні товщини колагенових волокон. Найменша ширина колагенових волокон відзначена у новоутвореннях малого розміру (T1) ($p < 0,0001$), у випадках категорії N1 ($p < 0,0001$) та у пухлинах

низького ступеня диференціювання ($p = 0,0042$). Як видно з рис. 3.12., у пацієнтів з метастазами в регіонарні лімфатичні вузли колагенові волокна у тканині РМЗ також мали значно вищі значення коефіцієнта прямолінійності ($p < 0,0001$). Зв'язку між значенням кута колагенових волокон та основними клініко-патологічними характеристиками РМЗ не виявлено.

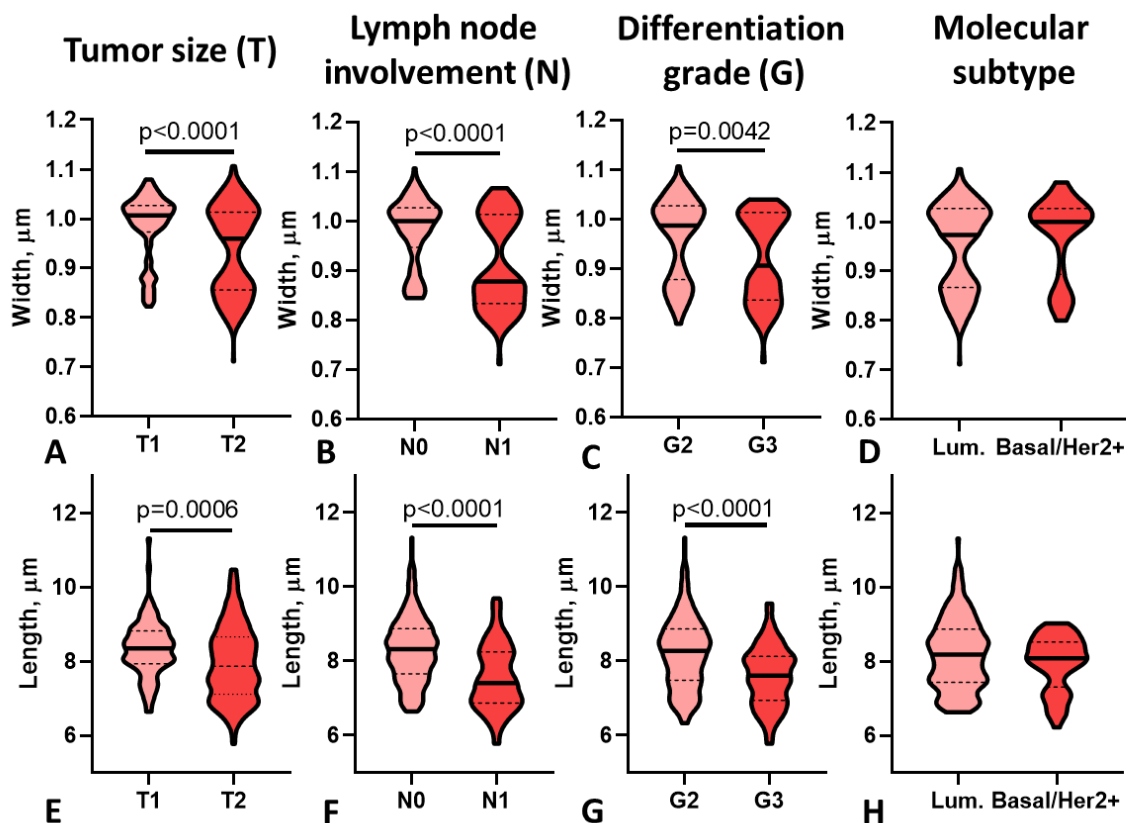


Рис.3.11. Кількісні показники (А-Д – ширина, Е-Н – довжина) просторової організації колагену у тканині РМЗ залежно від клінічного статусу хворих

Висока щільність колагенових волокон спостерігалася у тканині РМЗ пацієнток, новоутворення яких були більшого розміру ($p=0,0027$), у випадках наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів ($p<0,0001$) та у пухлинах низького ступеня диференціювання ($p<0,0001$). Значення TSR були значно вищими у тканині РМЗ базального та HER2/neu-позитивного молекулярних підтипів РМЗ ($p<0,0001$) порівняно з пухлинами

люмінальних підтипів. Також було показано, що значення TSR мали прямий зв'язок зі статусом ураження лімфатичних вузлів ($p < 0,0001$) та обернений зв'язок зі ступенем диференціювання пухлин ($p = 0,0102$).

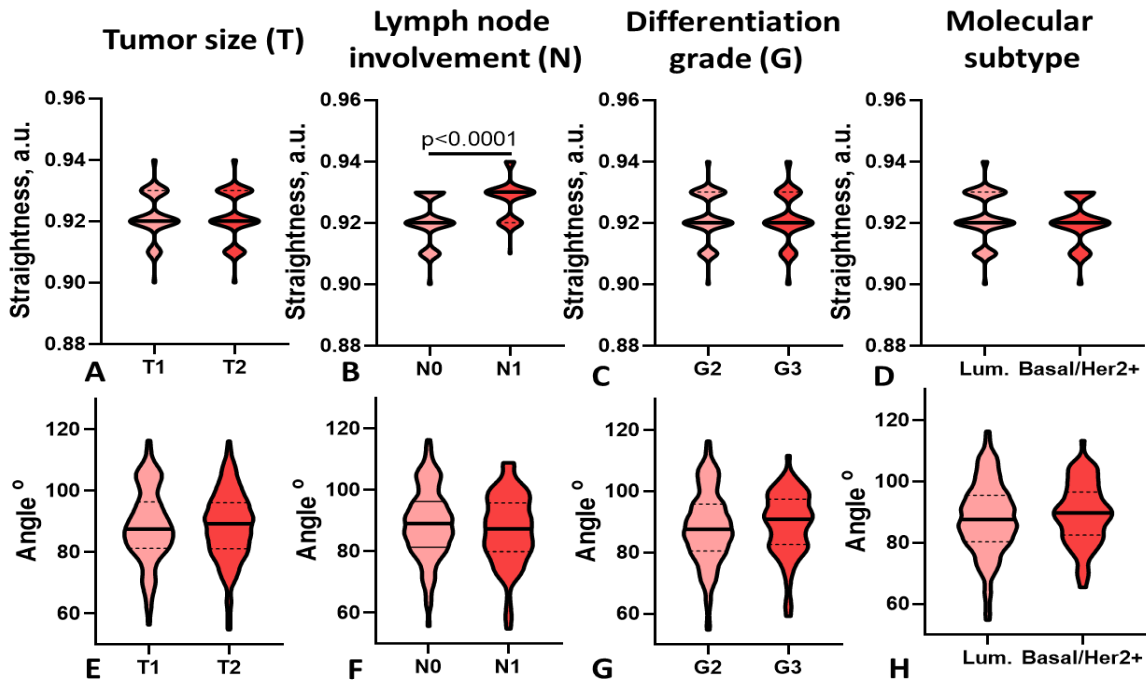


Рис.3.12. Кількісні показники (А–D — прямолінійність, Е–Н — кут) просторової організації колагену в тканині РМЗ залежно від клінічного статусу хворих

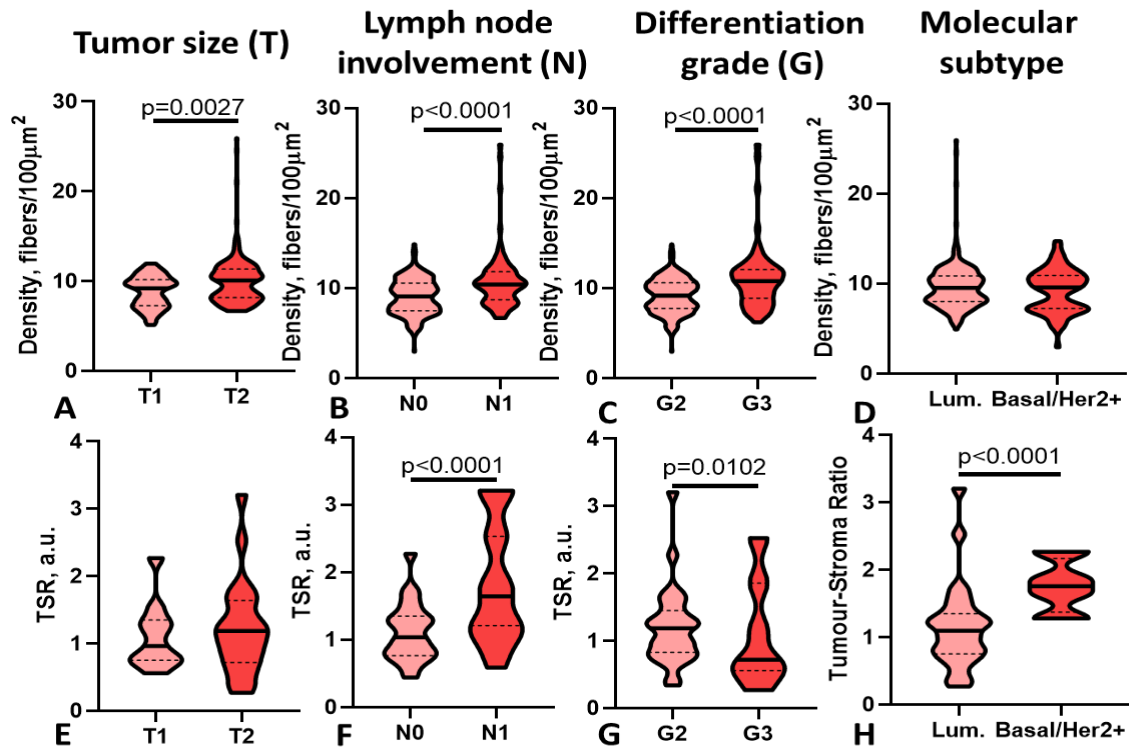


Рис.3.13. Кількісні показники (А–D — щільність, Е–Н — TSR) просторової організації колагену в тканині РМЗ, залежно від клінічного статусу хворих.

3.3. Архітектоніка колагенової стромы РМЗ із різним метастатичним статусом

Окремим фрагментом дослідження став аналіз особливостей просторової організації колагенових волокон у попарних зразках пухлинної тканини та метастатично уражених лімфатичних вузлів.

Проведений морфометричний аналіз колагенових волокон показав наявність змін їхньої довжини залежно від ступеня поширеності пухлинного процесу. Встановлено, що у первинних пухлинах молочної залози без ознак регіонарного метастазування (категорія N0) довжина колагенових волокон була статистично більшою порівняно з відповідним показником в умовно нормальній тканині молочної залози. Зокрема, значення даного параметра

збільшувалося в 1,5 раза, що свідчить про суттєве ремоделювання колагенового матриксу вже на ранніх етапах розвитку пухлинного процесу.

Разом з тим, у пацієнток із наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (категорії N1–3) спостерігалось достовірне зменшення довжини колагенових волокон порівняно з групою хворих категорії N0 у 1,2 раза, що відображало зміну структурної організації колагенового компонента позаклітинного матриксу при прогресуванні захворювання. Таким чином, максимальні значення довжини колагенових волокон реєструвалися саме у тканині РМЗ пацієнток без регіонарних метастазів, тоді як за наявності метастатичного процесу відзначалася тенденція до зниження цього параметра.

При аналізі тканини лімфатичних вузлів статистично значущих відмінностей за довжиною колагенових волокон між досліджуваними групами не виявлено. Лімфатичні вузли, не уражені метастазами, характеризувалися середньою довжиною колагенових волокон на рівні $5,06 \pm 0,06$ мкм. У свою чергу, у лімфатичних вузлах з ознаками метастатичного ураження відповідний показник становив $5,34 \pm 0,05$ мкм. Незважаючи на дещо вищі абсолютні значення у метастатично зміненій тканині, виявлені відмінності не досягали рівня статистичної значущості.

Подібні зміни були встановлені і при дослідженні ширини колагенових волокон. В умовно нормальній тканині молочної залози середнє значення цього показника складало $0,665 \pm 0,004$ мкм. У тканині РМЗ пацієнток категорії N0 відзначалося статистично значуще збільшення ширини колагенових волокон до $0,953 \pm 0,004$ мкм. Отримані дані свідчать, що в первинних пухлинах без ознак регіонарного метастазування колагенові волокна характеризувалися не лише більшою довжиною, а й значно більшою товщиною порівняно з умовно нормальною тканиною.

У тканині РМЗ хворих категорії N1–3 ширина колагенових волокон була достовірно меншою порівняно з відповідним показником у групі N0 РМЗ та становила $0,799 \pm 0,009$ мкм. Отже, зі збільшенням поширеності пухлинного процесу та появою регіонарних метастазів спостерігалось зменшення ширини колагенових волокон. Водночас значення цього показника залишалось вищим порівняно з умовно нормальною тканиною молочної залози. Загалом, отримані результати демонструють односпрямовані зміни довжини та ширини колагенових волокон, що проявлялися їхнім зменшенням у наявності регіонарного метастазування (рис. 3.14).

Аналіз коефіцієнта прямолінійності колагенових волокон показав відносно незначну варіабельність даного показника між досліджуваними групами. В умовно нормальній тканині молочної залози середнє значення коефіцієнта прямолінійності становило $0,9132 \pm 0,0013$. У первинних пухлинах без регіонарного метастазування (N0) спостерігалось незначне підвищення цього показника до $0,9171 \pm 0,0006$, однак виявлені відмінності не досягали рівня статистичної значущості порівняно з умовно нормальною тканиною. Аналогічні значення були характерні і для пухлин із регіонарним метастазуванням (N1–3), де коефіцієнт прямолінійності становив $0,9164 \pm 0,0006$, що також не відрізнялося від відповідного показника умовно нормальної тканини молочної залози.

У групі пацієток із віддаленими метастазами (M1) середнє значення коефіцієнта прямолінійності дорівнювало $0,9124 \pm 0,0007$. Порівняння даної групи з умовно нормальною тканиною молочної залози не виявило статистично значущих відмінностей. Водночас при зіставленні груп M1 РМЗ та N0 РМЗ було встановлено достовірне зниження коефіцієнта прямолінійності у пацієток із віддаленим метастазуванням ($p < 0,0001$). Подібна закономірність спостерігалася і при порівнянні груп M1 РМЗ та N1–3 РМЗ, де також було виявлено статистично значущу різницю ($p = 0,0012$).

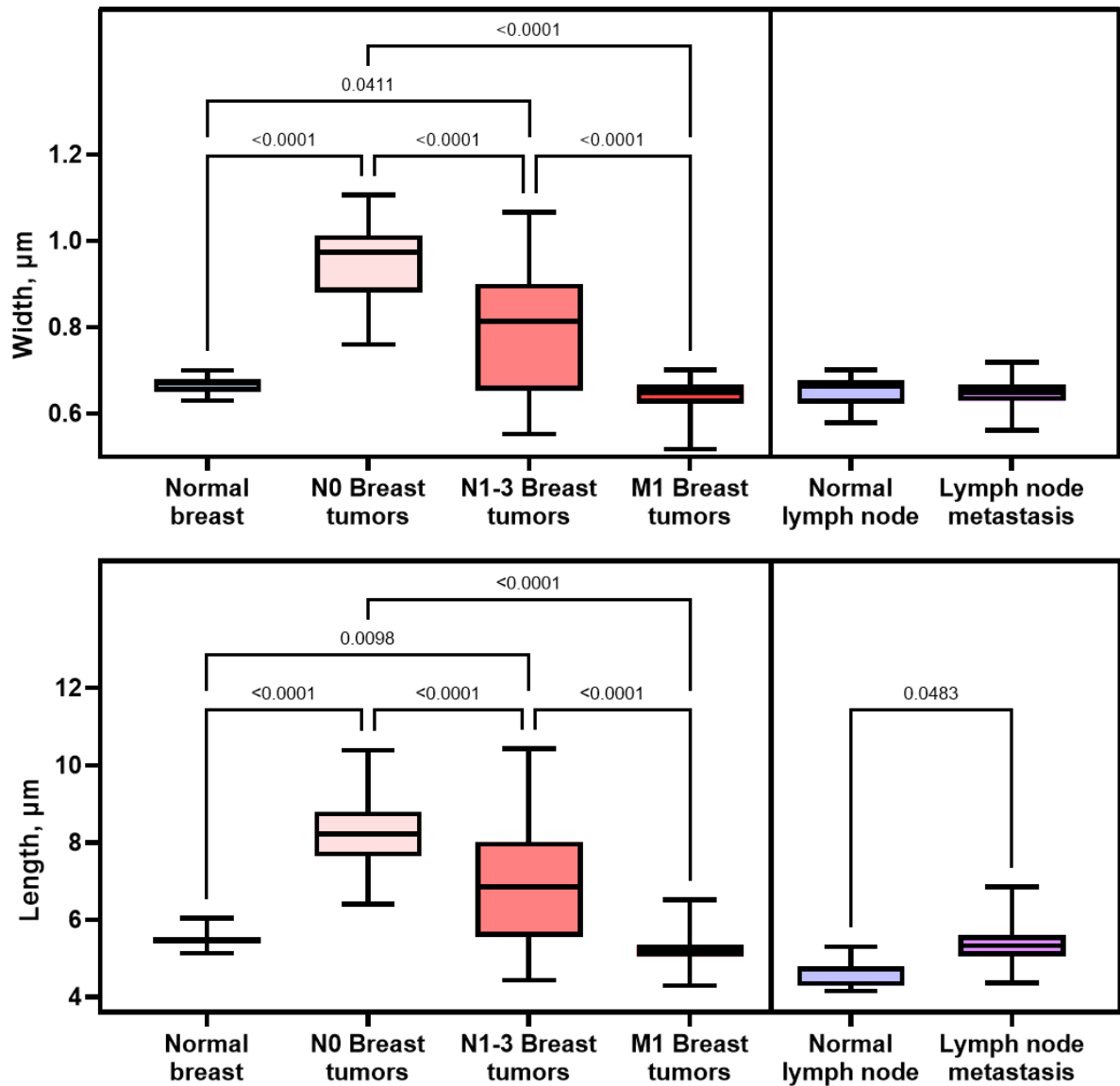


Рис. 3.14. Довжина та ширина колагенових волокон у тканині РМЗ хворих із різним метастатичним статусом, а також у тканині метастатично уражених регіонарних лімфатичних вузлів.

Найвищі значення коефіцієнта прямолінійності були зареєстровані в умовно нормальних лімфатичних вузлах, де середній показник становив $0,9246 \pm 0,0013$. Порівняно з усіма дослідженими групами тканини молочної залози, дане значення було статистично значуще вищим. Зокрема, відмінності були достовірними при порівнянні з умовно нормальною тканиною молочної залози ($p < 0,0001$), пухлинами групи N0 РМЗ ($p =$

0,0021), пухлинами групи N1–3 РМЗ ($p = 0,0004$) та пухлинами групи M1 РМЗ ($p < 0,0001$).

Дослідження метастатично уражених лімфатичних вузлів встановило зниження коефіцієнта прямолінійності до $0,9164 \pm 0,0008$. При цьому значення показника практично відповідало такому у пухлинах групи N1–3 РМЗ та не відрізнялося від нього статистично. Разом з тим, порівняння метастатично уражених та умовно нормальних лімфатичних вузлів продемонструвало достовірне зменшення коефіцієнта прямолінійності за наявності метастазів ($p = 0,0012$). Крім того, показник у метастазах лімфатичних вузлів був статистично значуще вищим порівняно з пухлинами групи M1 РМЗ ($p = 0,0331$).

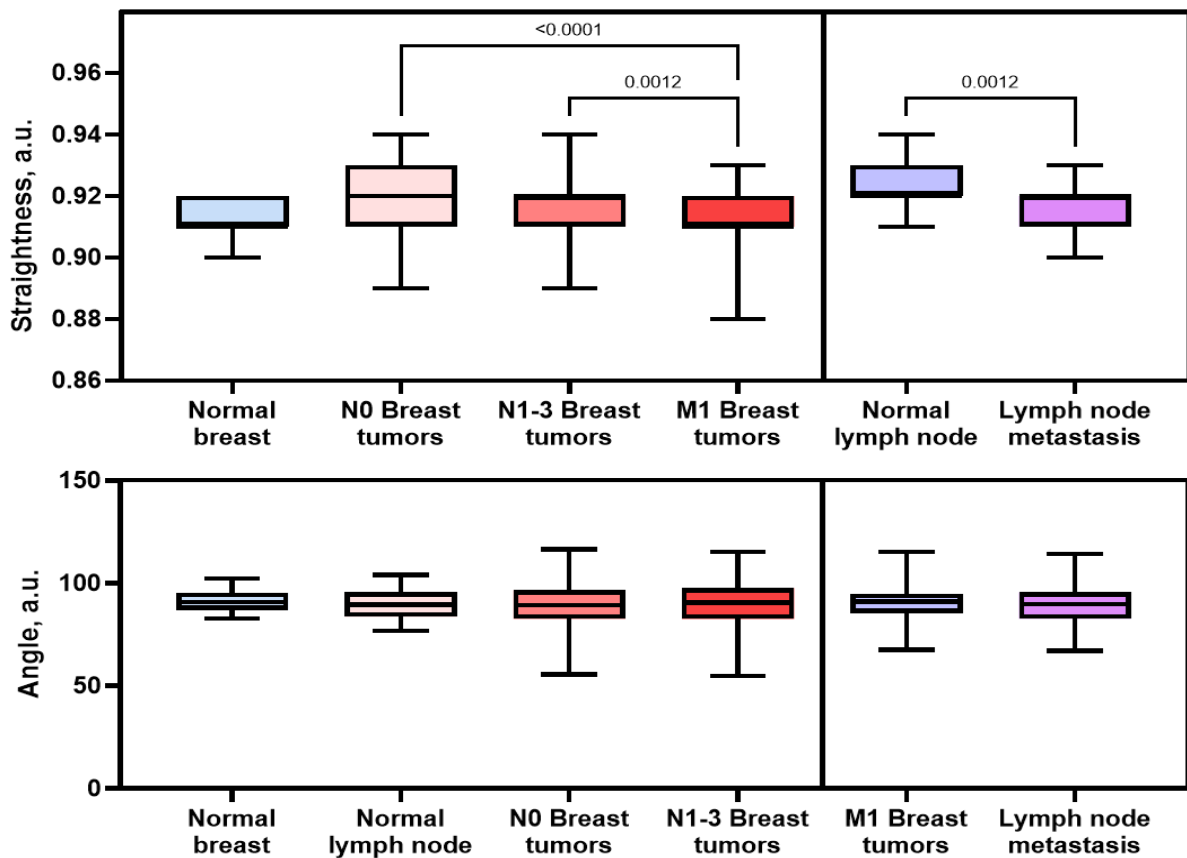


Рис. 3.15. Прямолінійність та кут колагенових волокон у тканині РМЗ хворих із різним метастатичним статусом, а також у тканині метастатично уражених регіонарних лімфатичних вузлів.

Таким чином, коефіцієнт прямолінійності колагенових волокон характеризувався відносно стабільними значеннями у тканині молочної залози незалежно від стадії пухлинного процесу. Найбільш високі значення показника були притаманні умовно нормальним лімфатичним вузлам, тоді як при метастатичному ураженні лімфатичних вузлів відзначалося його достовірне зниження. У первинних пухлинах найбільш виражені зміни коефіцієнта прямолінійності спостерігалися на стадії віддаленого метастазування, що проявлялося зменшенням показника порівняно з пухлинами без віддалених метастазів. Значення кута у хворих із різним статусом розповсюдженості пухлинного процесу достовірно не відрізнялися.

Останнім етапом стала оцінка морфометричних параметрів колагенової матриці у тканині РМЗ хворих із віддаленими метастазами різної локалізації. Показано, що характерною особливістю РМЗ категорії М1 із діагностованими метастазами до легенів є статистичне підвищення ширини волокон ($p < 0,05$) на фоні зниження їх довжини ($p < 0,05$) порівняно із тканиною первинної пухлини пацієнток їх маніфестацією захворювання у кісткову тканину та печінку.

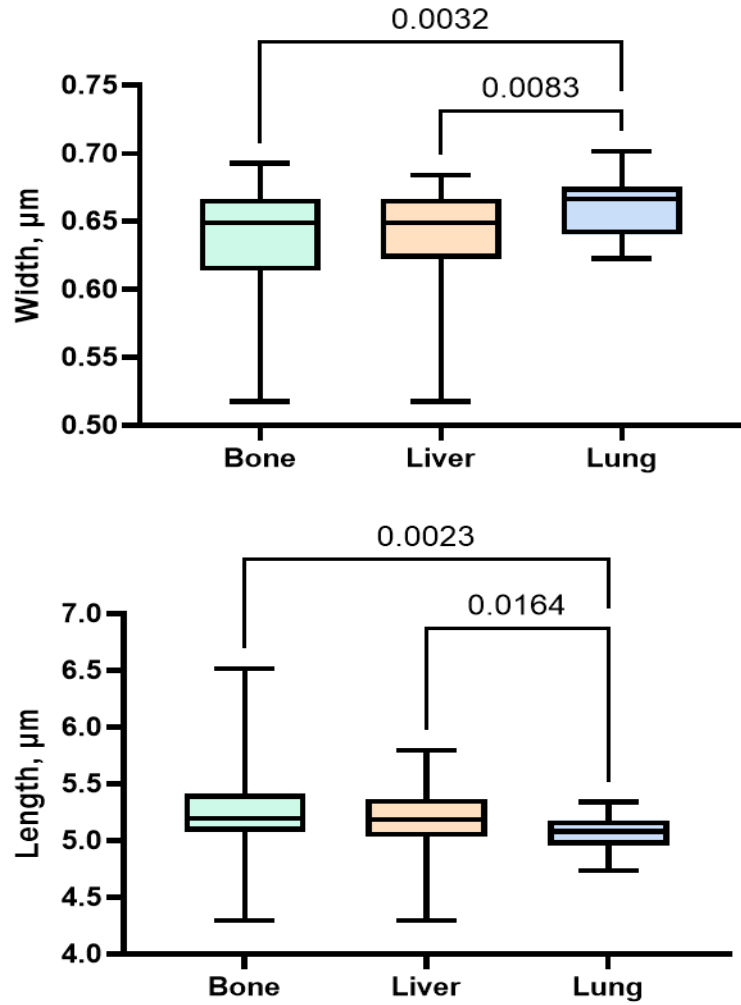


Рис. 3.16. Довжина та ширина колагенових волокон у тканині РМЗ залежно від сайту віддаленого метастазування.

Крім того, показано, що метастазування РМЗ до кісткової тканини характеризується зростанням коефіцієнта прямолінійності ($p < 0,05$) у пухлинній тканині. Такі зміни свідчать про загальне вирівнювання колагенових ниток саме у первинній пухлині РМЗ за умов розвитку віддалених метастазів до кісток, що певною мірою нагадує архітекtonіку вторинної метастатичної ніші.

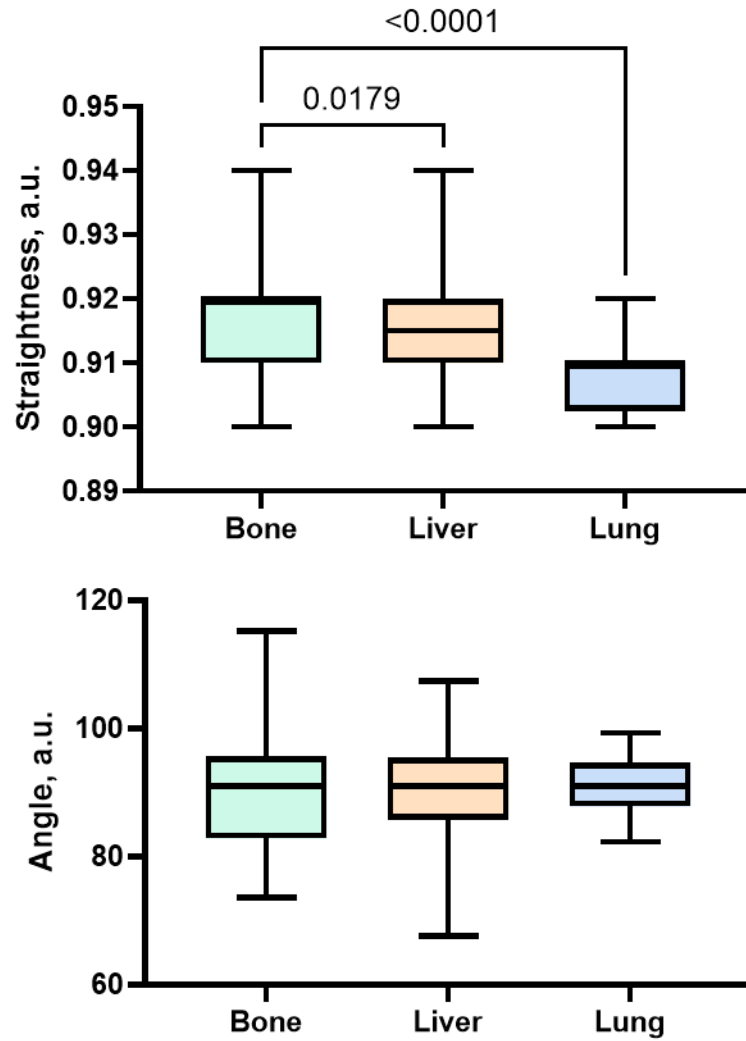


Рис. 3.17. Прямолінійність та кут колагенових волокон у тканині РМЗ залежно від сайту віддаленого метастазування.

Результати проведених досліджень в розділі 3 опубліковано у [99, 130–130].

РОЗДІЛ 4. ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПРОФІЛЮ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ КОЛАГЕНІВ ТА БІЛКІВ РЕМОДЕЛЮВАННЯ КОЛАГЕНОВОЇ МАТРИЦІ У ТКАНИНІ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

4.1. *In silico* аналіз клінічного значення показників експресії білкових компонентів колагенової строми РМЗ

4.1.1. Біоінформатична оцінка діагностичного та прогностичного потенціалу експресії колагенів фібрилярного типу на рівні білка у тканині новоутворень молочної залози

Проведений нами за допомогою онлайн-ресурсу UALCAN біоінформатичний аналіз особливостей експресії колагенів фібрилярного типу на рівні білка продемонстрував, що тканина РМЗ характеризується відсутністю достовірної різниці показників експресії COL1A1 ($p > 0,05$) та COL3A1 ($p > 0,05$) у нормальній та злоякісно трансформованій тканині молочної залози (Рис.4.1.).

Аналіз показників гену *COL1A1* на рівні білка встановив суттєве зростання рівня цього протеїну у тканині РМЗ хворих віком 41–80 років порівняно із пацієнтками віком 81–100 років. Найбільші показники експресії COL1A1 ідентифіковано у тканині інфільтративного долькового РМЗ I стадії ($p < 0,05$). Встановлено, що рівень експресії COL1A1 у тканині РМЗ люмінальних молекулярних підтипів був достовірно більшим ($p < 0,05$) порівняно із аналогічним показником у новоутвореннях базального молекулярного підтипу. Достовірної різниці між показниками експресії COL1A1 на рівні білка у пухлинній тканині хворих із люмінальними та HER2/neu-позитивними молекулярними підтипами, а також між показниками у пухлинах HER2/neu-позитивного та базального молекулярного підтипів не виявлено (Рис.4.2).

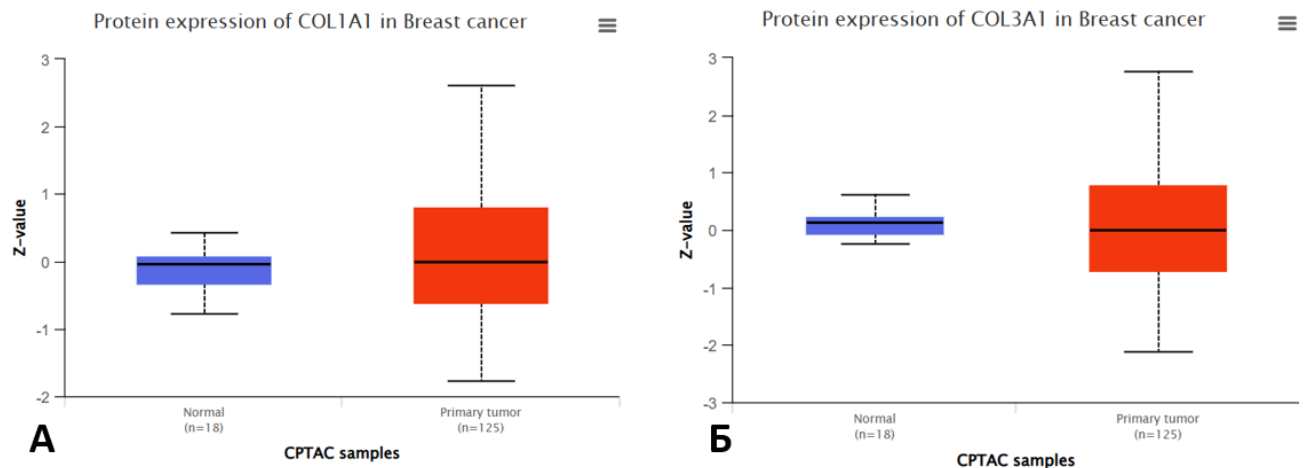


Рис.4.1. Показники експресії COL1A1 (А) та COL3A1 (Б) у тканині РМЗ відповідно до бази даних UALCAN

Аналіз показників *COL3A1* на рівні білка залежно від віку хворих на РМЗ (рис.4.3) встановив достовірно вищі показники у новоутвореннях пацієток віком 41–60 років порівняно із групою хворих у віковому діапазоні 81–100 років. Рівні *COL3A1* також були достовірно більшими у тканині РМЗ хворих I стадії у порівнянні із показниками пацієнтів із II та III стадіями пухлинного процесу. Виявлено, що характерною ознакою інфільтративного протокового РМЗ є суттєве зниження рівня *COL3A1* порівняно із тканиною інфільтративного долькового РМЗ. Встановлено, що рівень експресії *COL3A1* у тканині РМЗ люмінальних молекулярних підтипів був достовірно вищим у порівнянні із аналогічним показником у новоутвореннях базального молекулярного підтипу. Достовірної різниці між показниками експресії *COL3A1* у пухлинній тканині хворих із люмінальними та HER2/neu-позитивним молекулярними підтипами, а також між показниками у пухлинах HER2/neu-позитивного та базального молекулярного підтипів не виявлено.

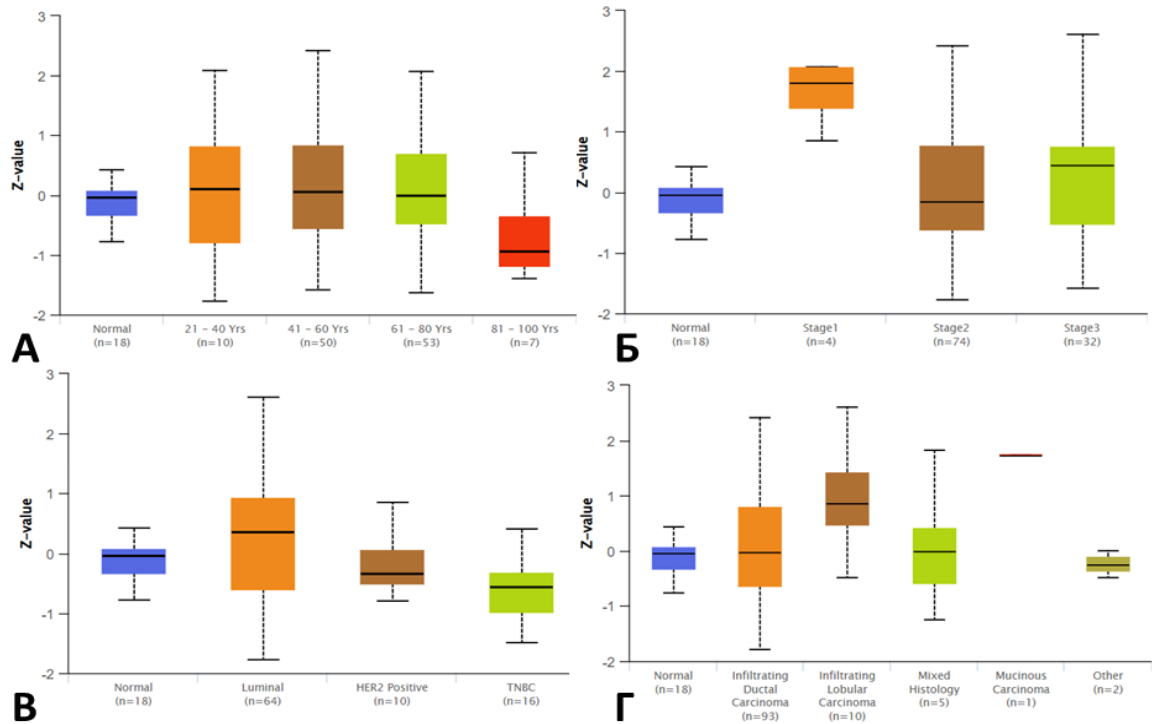


Рис.4.2. Залежність показників експресії гену *COL1A1* на рівні білка у пухлинній тканині хворих на РМЗ від: віку (А), стадії (Б), молекулярного підтипу (В) та гістологічного типу РМЗ (Г); відповідно до UALCAN

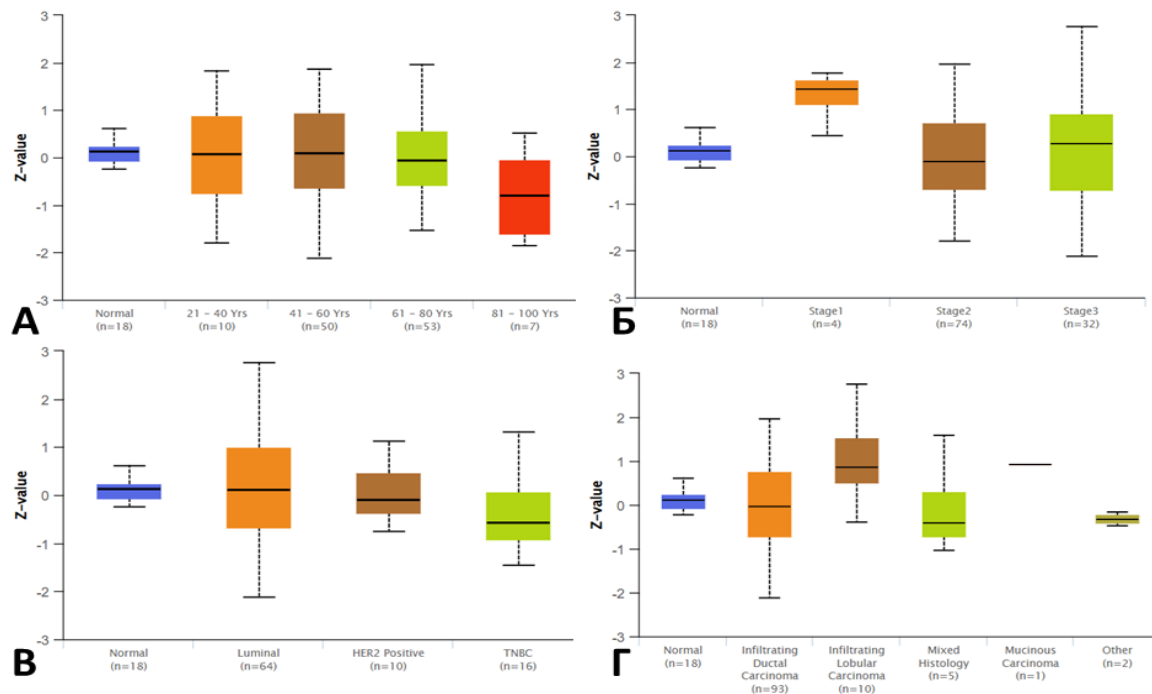


Рис.4.3. Залежність показників експресії гену *COL3A1* на рівні білка у пухлинній тканині хворих на РМЗ від: віку (А), стадії (Б), молекулярного підтипу (В) та гістологічного типу РМЗ (Г); відповідно до UALCAN.

4.1.2. Визначення прогностичного значення білків ремоделювання стромы у хворих на РМЗ з використанням відкритих баз даних.

При аналізі експресії MMP на рівні білка продемонстровано, що розвиток РМЗ супроводжується зменшенням рівня MMP8 в 5,7 разів ($p < 0,05$) у пухлинних клітинах (рис.4.4). Не виявлено достовірних відмінностей у показниках експресії MMP1 на рівні білка в нормальній та злоякісно трансформованій тканині молочної залози.

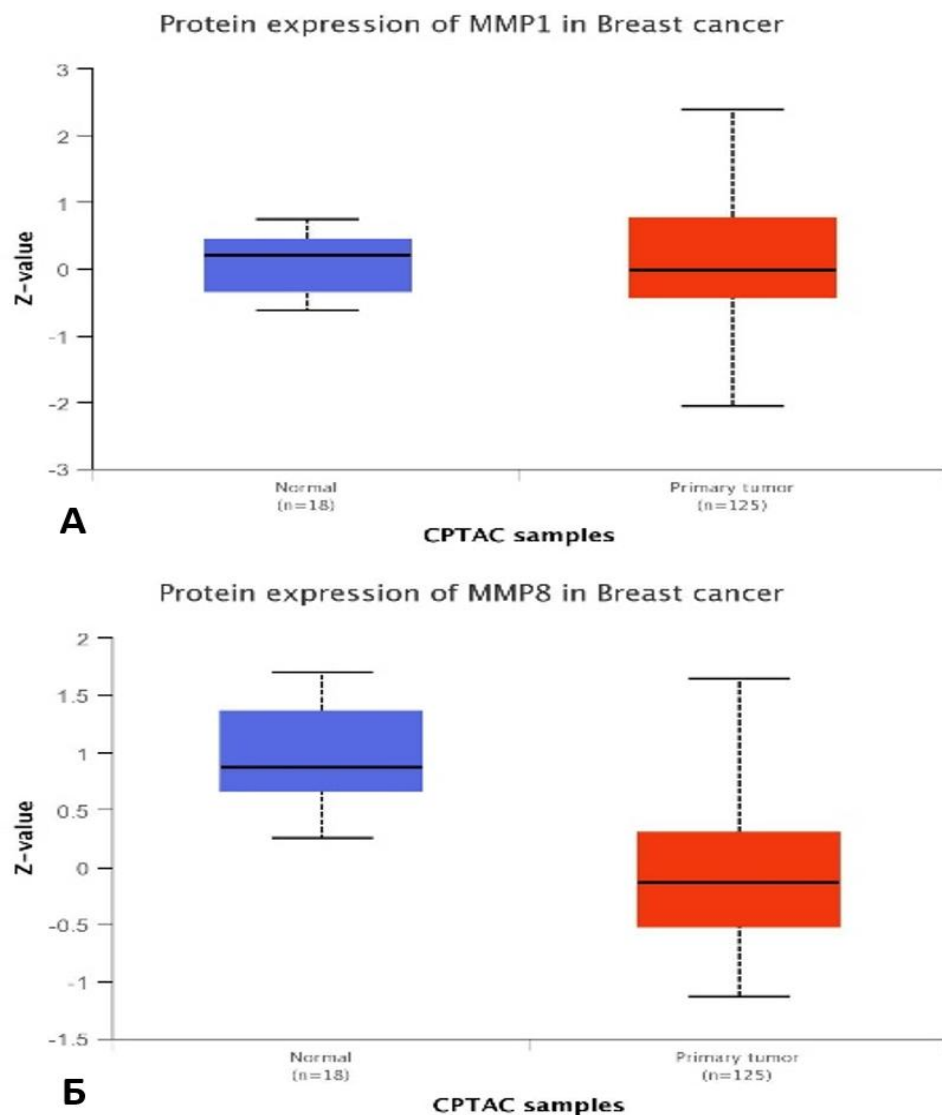


Рис. 4.4. Експресія MMP-1 (А) та MMP-8 (Б) на рівні білка у немалігнізованій та злоякісно трансформованій тканині молочної залози

Надалі було проведено аналіз зв'язку показників експресії MMP у тканині РМЗ із основними клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу.

При аналізі експресії MMP1 на рівні білка зафіксовано зростання показників цього маркера у тканині тричі негативного РМЗ порівняно із люмінальними підтипами РМЗ (рис. 4.5). Не встановлено залежності експресії *MMP1* на рівні білка від таких клініко-патологічних особливостей РМЗ, як вік хворих, стадія пухлинного процесу, наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів та гістологічний тип новоутворень.

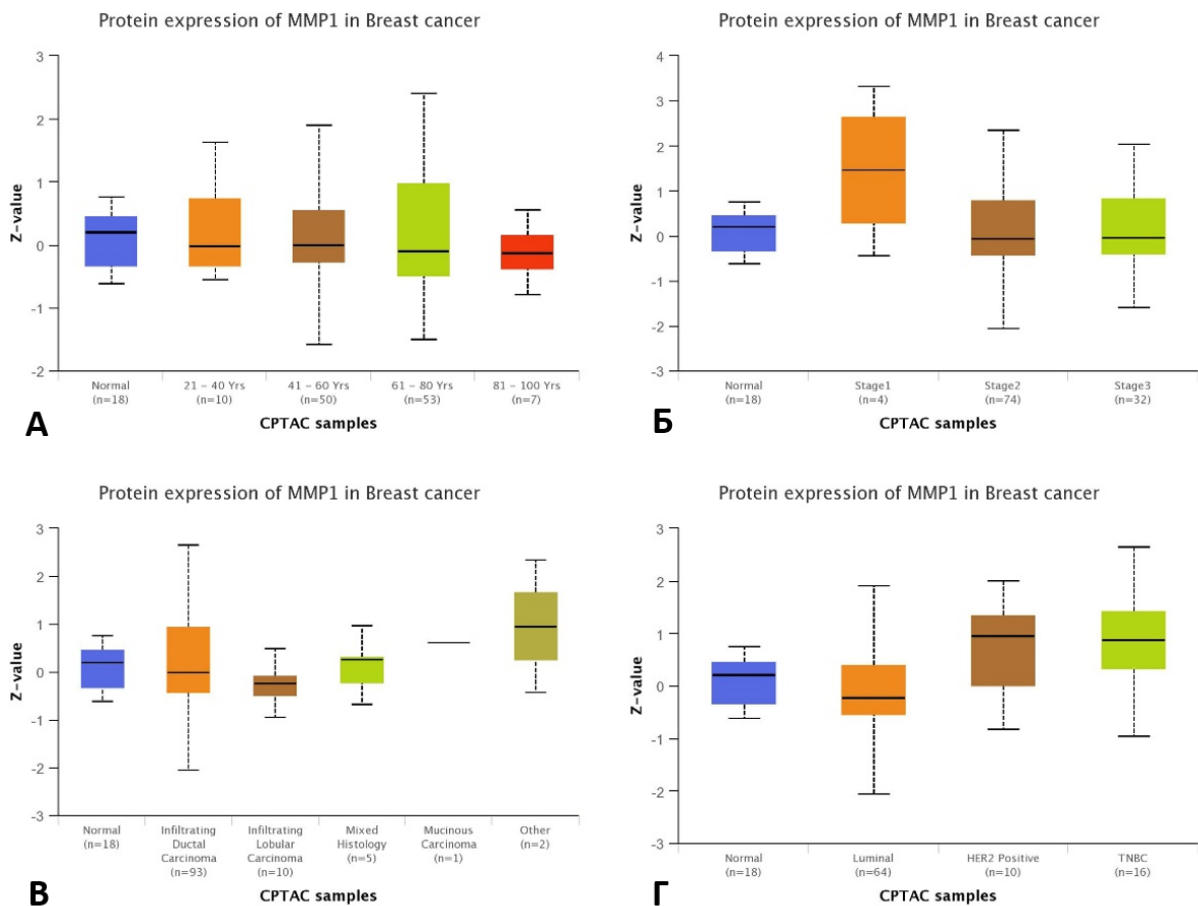


Рис. 4.5. Зв'язок показників експресії *MMP1* на рівні білка із віком хворих (А), стадією (Б), гістологічним типом (В) та молекулярним підтипом (Г) РМЗ.

Згідно з інформацією, наведеною у базі даних UALCAN, з'ясовано, що експресія MMP8 на рівні білка у тканині РМЗ не залежить від основних клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу (рис.4.6).

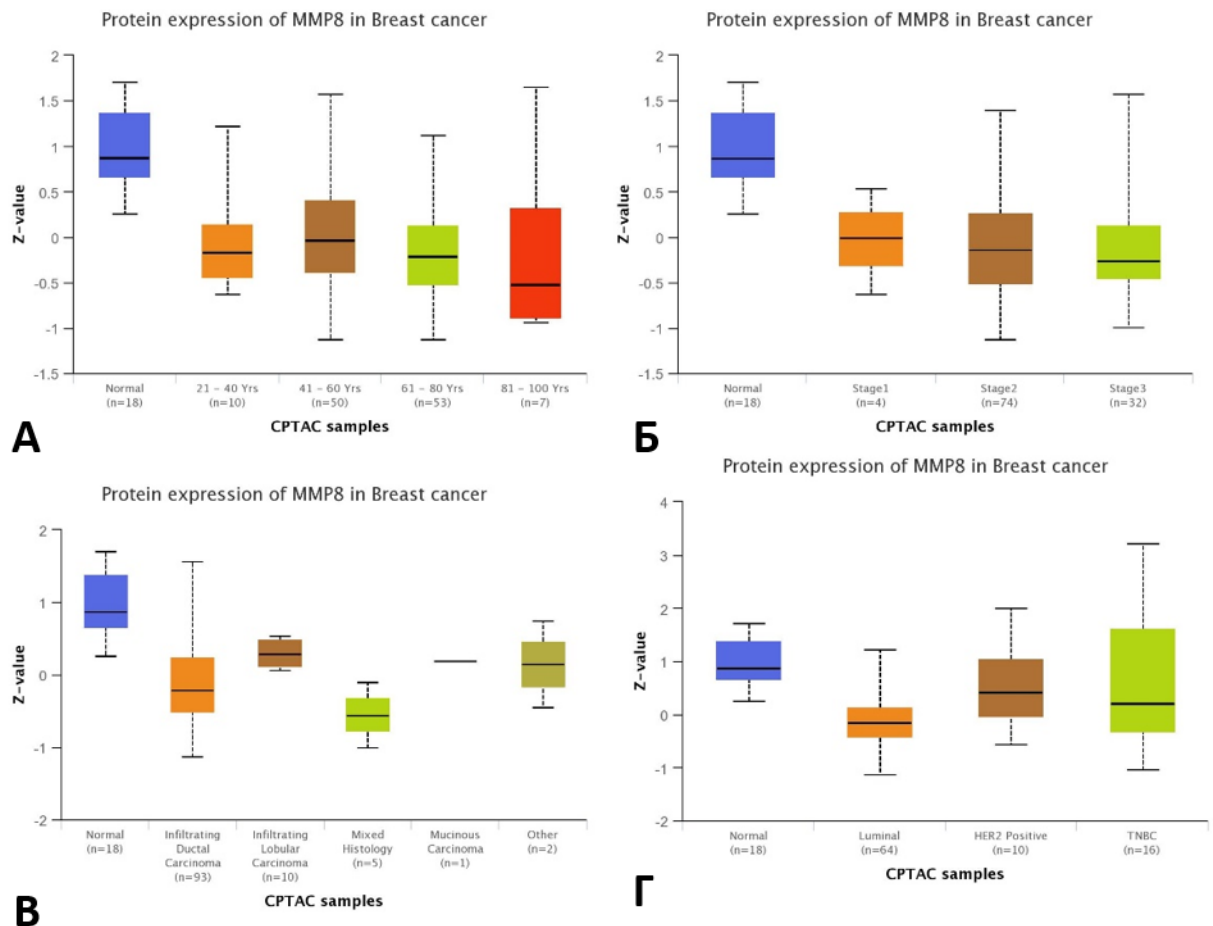


Рис. 4.6. Зв'язок показників експресії *MMP8* на рівні білка із віком хворих (А), стадією (Б), гістологічним типом (В) та молекулярним підтипом (Г) РМЗ

Таким чином, результати проведеного аналізу відкритих баз даних свідчать, що тканина РМЗ характеризується низькими показниками експресії MMP-8 на рівні білка порівняно з немалігнізованою тканиною молочної залози. Отримані дані вказують на перспективність використання показників експресії генів матричних металопротеїназ на рівні білка з метою прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу у хворих на РМЗ.

Надалі нами проведено оцінку рівнів експресії тканинного інгібітора ММР TIMP3 залежно від клінічного статусу хворих на РМЗ. Показано, що тканина злоякісних новоутворень молочної залози характеризується зниженням експресії TIMP3 у 15,18 ($p < 0,05$) разів порівняно із немалігнізованою тканиною (Рис.4.7.).

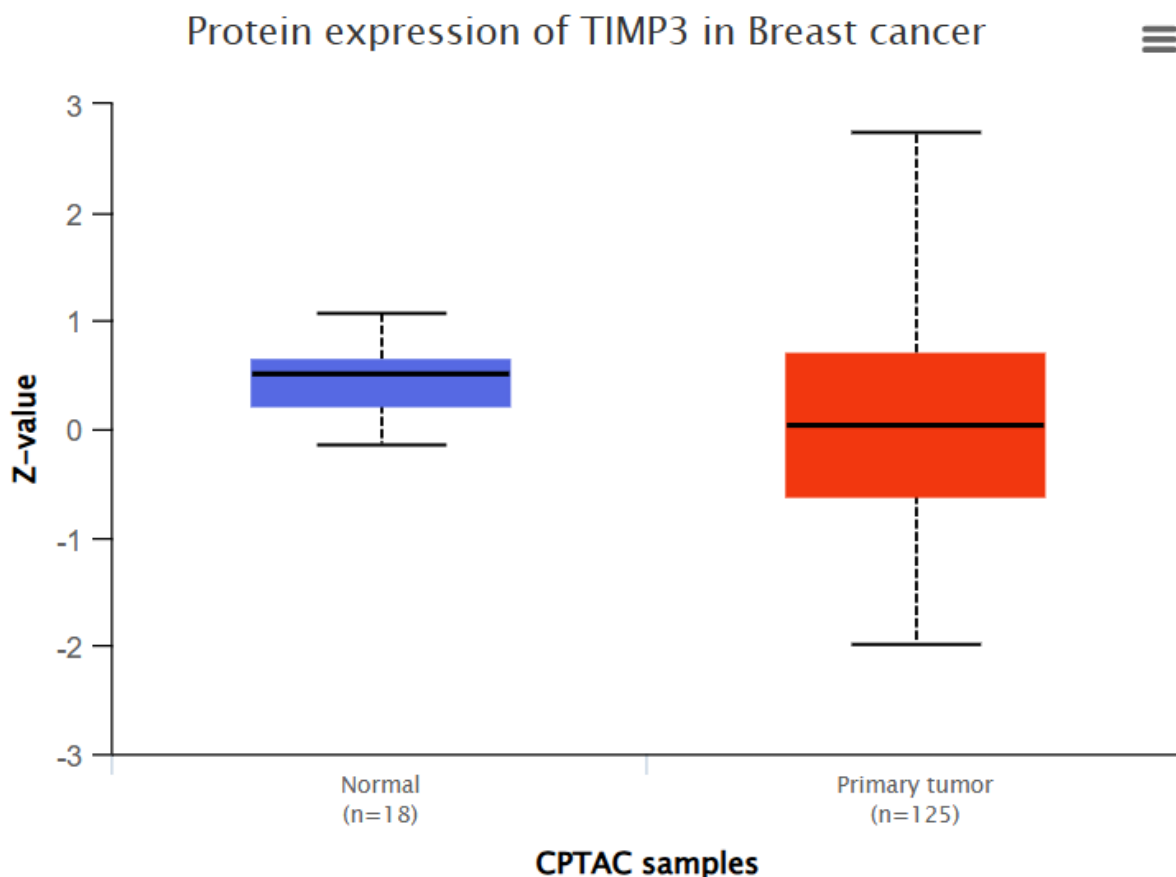


Рис. 4.7. Експресія TIMP3 на рівні білка у немалігнізованій та злоякісно трансформованій тканині молочної залози

При оцінці експресії TIMP3 на рівні білка залежності від стадії пухлинного процесу, молекулярного підтипу та гістологічного типу статистично значущих відмінностей виявлено не було. Варто зазначити динаміку зростання рівнів цієї молекули із віком хворих (рис.4.8.). Когорта пацієнтів із РМЗ віком від 21 до 40 років характеризується статистично найнижчими значеннями експресії TIMP3, тоді як максимальних показників досягають у тканині РМЗ хворих віком від 81 до 100 років.

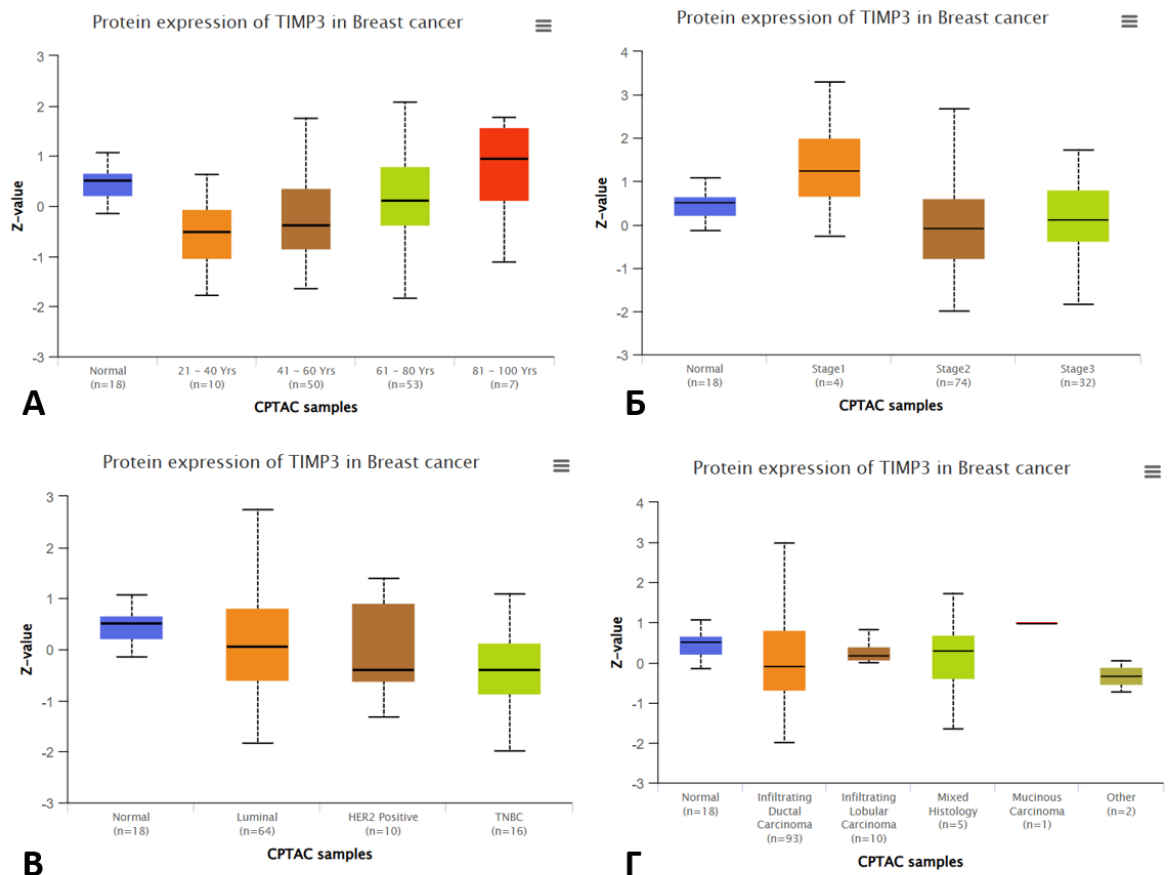


Рис. 4.8. Зв'язок показників експресії *TIMP3* на рівні білка із віком хворих (А), стадією (Б), гістологічним типом (В) та молекулярним підтипом (Г) РМЗ

Біоінформатичний аналіз дозволив встановити відсутність достовірної різниці у показниках експресії *LOX* на рівні білка у тканині РМЗ та немалігнізованої молочної залози (рис.4.9).

Protein expression of LOX in Breast cancer

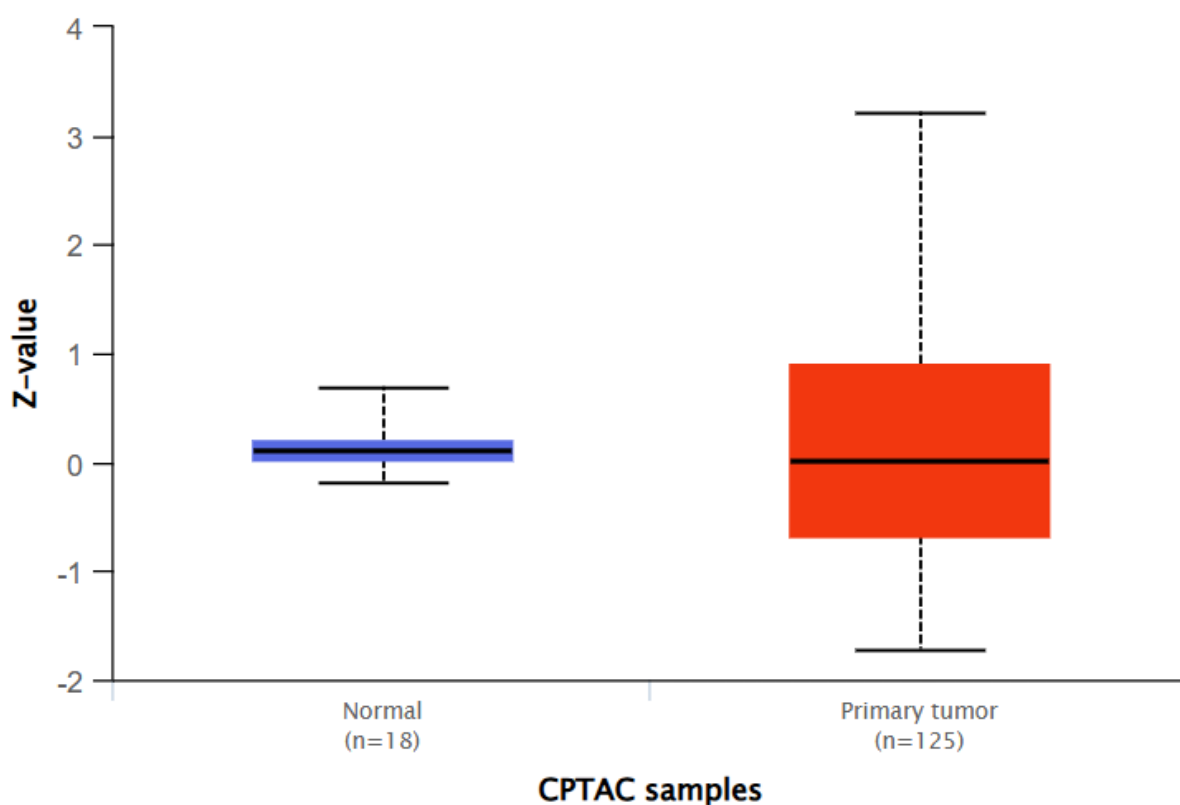


Рис. 4.9. Експресія LOX на рівні білка у немалігнізованих та злоякісно трансформованих тканині молочної залози

Показано, що у тканині долькової аденокарциноми 1-ї стадії притаманне статистично значуще зростання експресії LOX на рівні білка. Так, тканина РМЗ хворих 1-ї стадії характеризувалися у 5,84 ($p < 0,05$) та 5,77 ($p < 0,05$) разів вищими показниками експресії LOX порівняно із зразками РМЗ 2-ї та 3-ї стадій відповідно, тоді як у зразках післяопераційного матеріалу долькової аденокарциноми ці значення були на 89,2% ($p < 0,05$) вищими порівняно із тканиною протокового РМЗ (рис. 4.10).

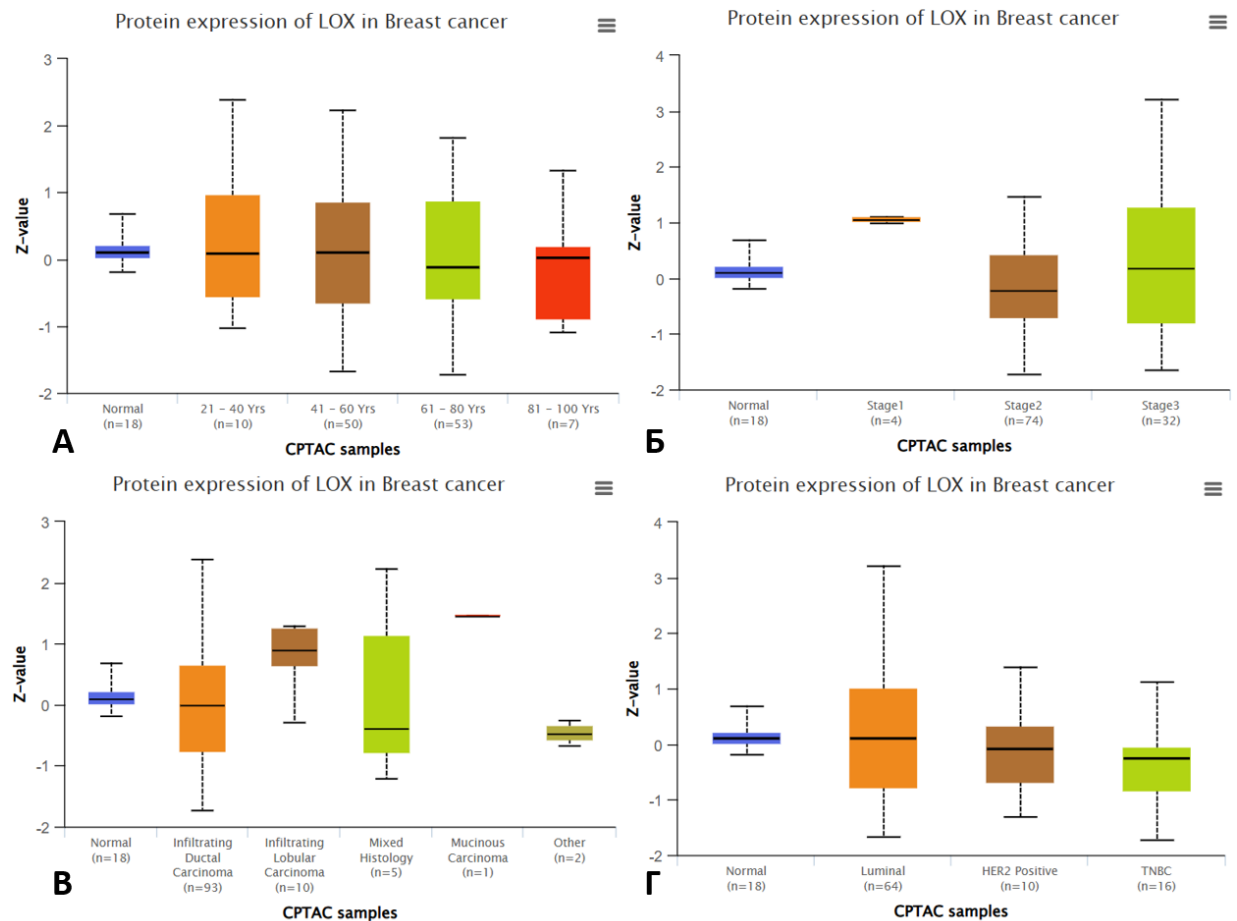


Рис. 4.10. Зв'язок показників експресії *LOX* на рівні білка із віком хворих (А), стадією (Б), гістологічним типом (В) та молекулярним підтипом (Г) РМЗ

4.2. Зв'язок показників експресії генів фібрилярних колагенів з клінічним статусом хворих на РМЗ ex vivo на клінічному матеріалі

Аналіз результатів імуногістохімічного дослідження показав, що позитивна реакція з антитілами до COL1A1 визначалася у вигляді коричневого дифузного забарвлення стромального компоненту РМЗ різного ступеня інтенсивності (від світло- до темно-коричневого). Експресія COL1A1 низької інтенсивності також детектувалася у цитоплазмі поодиноких злоякісно трансформованих клітин (рис.4.11). Водночас для COL3A1 була притаманна як цитоплазматична, так і стромальна локалізація, що в

подальшому вимагає окремого аналізу методом H-score та оцінки оптичної щільності.

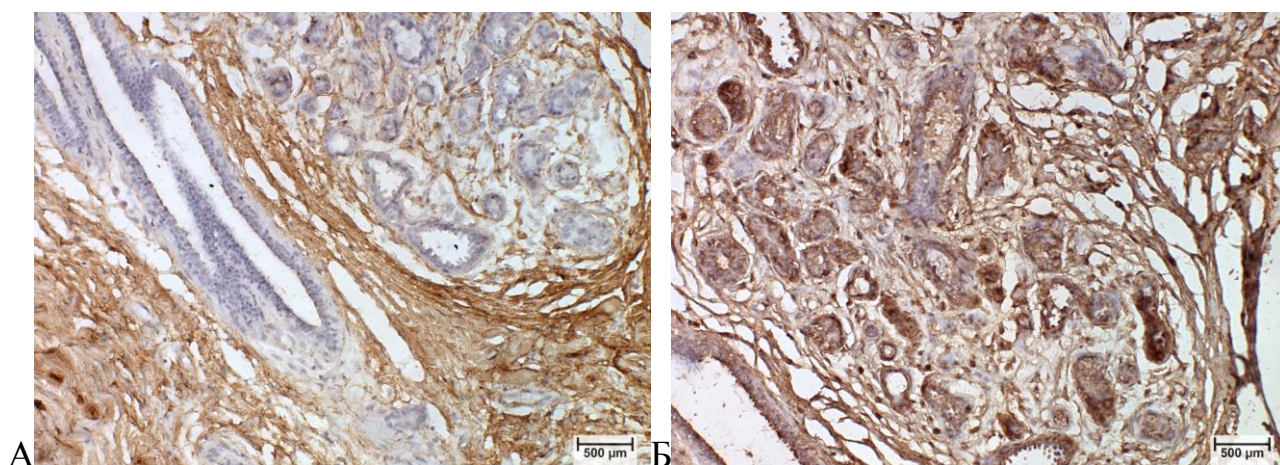


Рис.4.11. Експресія COL1 (А) та COL3 (Б) у тканині РМЗ. Імуногістохімічний метод, хромоген — 3-діамінобензидин тетрахлориду. Дофарбування гематоксиліном, $\times 200$.

Показано, що поширення пухлинного процесу до регіонарних лімфатичних вузлів асоціюється із зниженням оптичної щільності COL1A1 на 36,8% ($p < 0,05$) порівняно із тканиною РМЗ пацієнток без метастазів. Водночас зростання стадії захворювання пов'язане із підвищенням вмісту у стромі COL3A1. У хворих на другу стадію пухлинного процесу зафіксовано оптичну щільність цього типу колагену 1,81134 у.о., що на 32,9% ($p < 0,05$) більше порівняно із тканиною РМЗ першої стадії (рис.4.12.).

З'ясовано, що тканина РМЗ люмінального Б молекулярного підтипу характеризується найвищими рівнями експресії COL1 – 1,80451 у.о., що на 87,3% ($p < 0,05$) більше порівняно із тканиною потрійно негативного молекулярного підтипу. В той же час у тканині РМЗ базального підтипу відзначено збільшення рівнями клітинної експресії COL3A1, який становить 164,444 бали H-score та на 57,9% ($p < 0,05$) вища у порівнянні із зразками тканини новоутворень люмінального А-підтипу. Окрім того, у тканині

низькодиференційованої долькової аденокарциноми зафіксовано підвищення експресії цього колагену на 30,6% ($p<0,05$) та 33,8% ($p<0,05$) порівняно із зразками протокового РМЗ високого чи помірного ступеня диференціювання відповідно (рис.4.13).

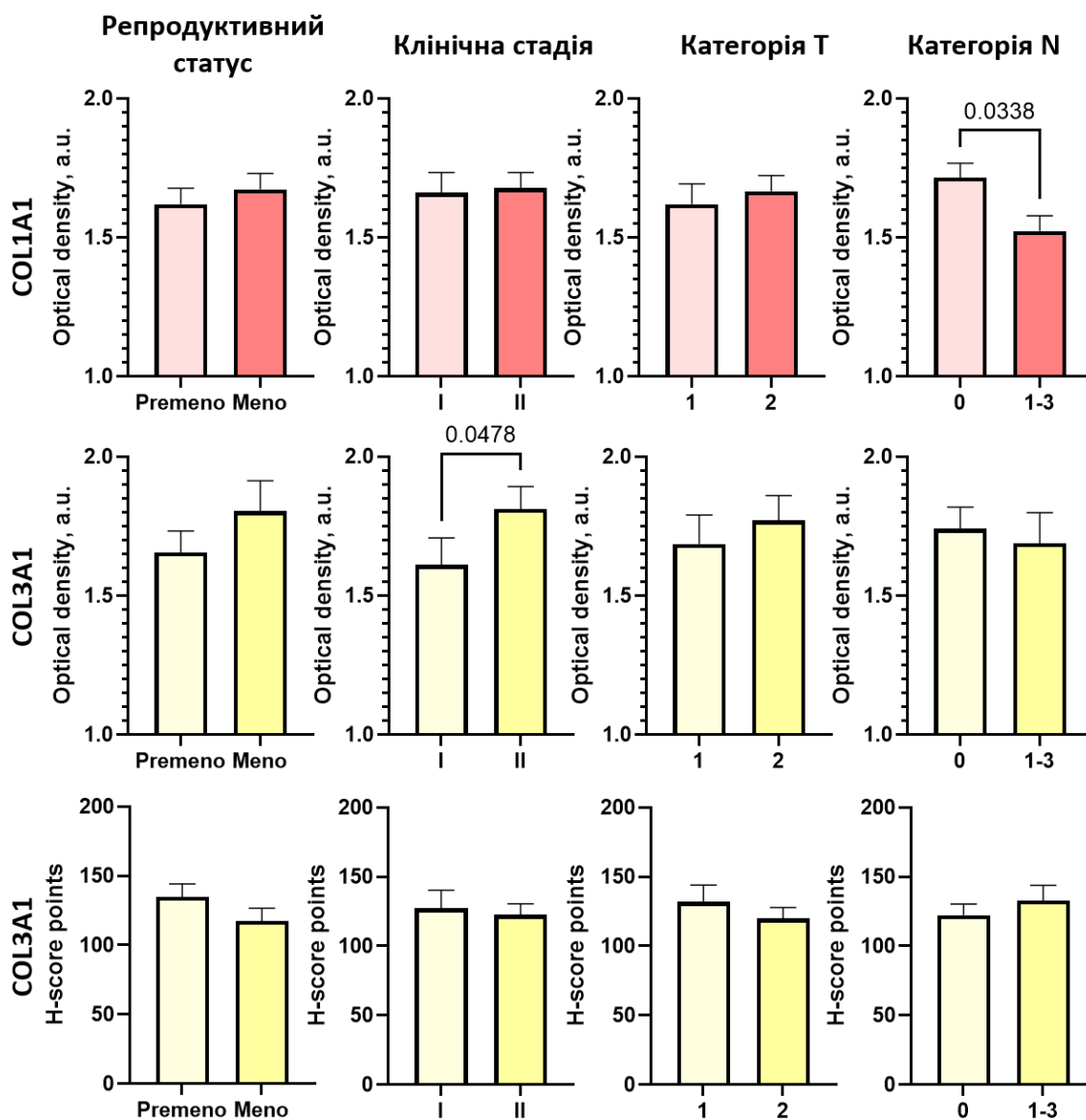


Рис.4.12. Зв'язок показників експресії COL1A1 та COL3A1 у пухлинній тканині з репродуктивним статусом, стадією, розміром новоутворень (категорія T) та статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N) хворих на РМЗ

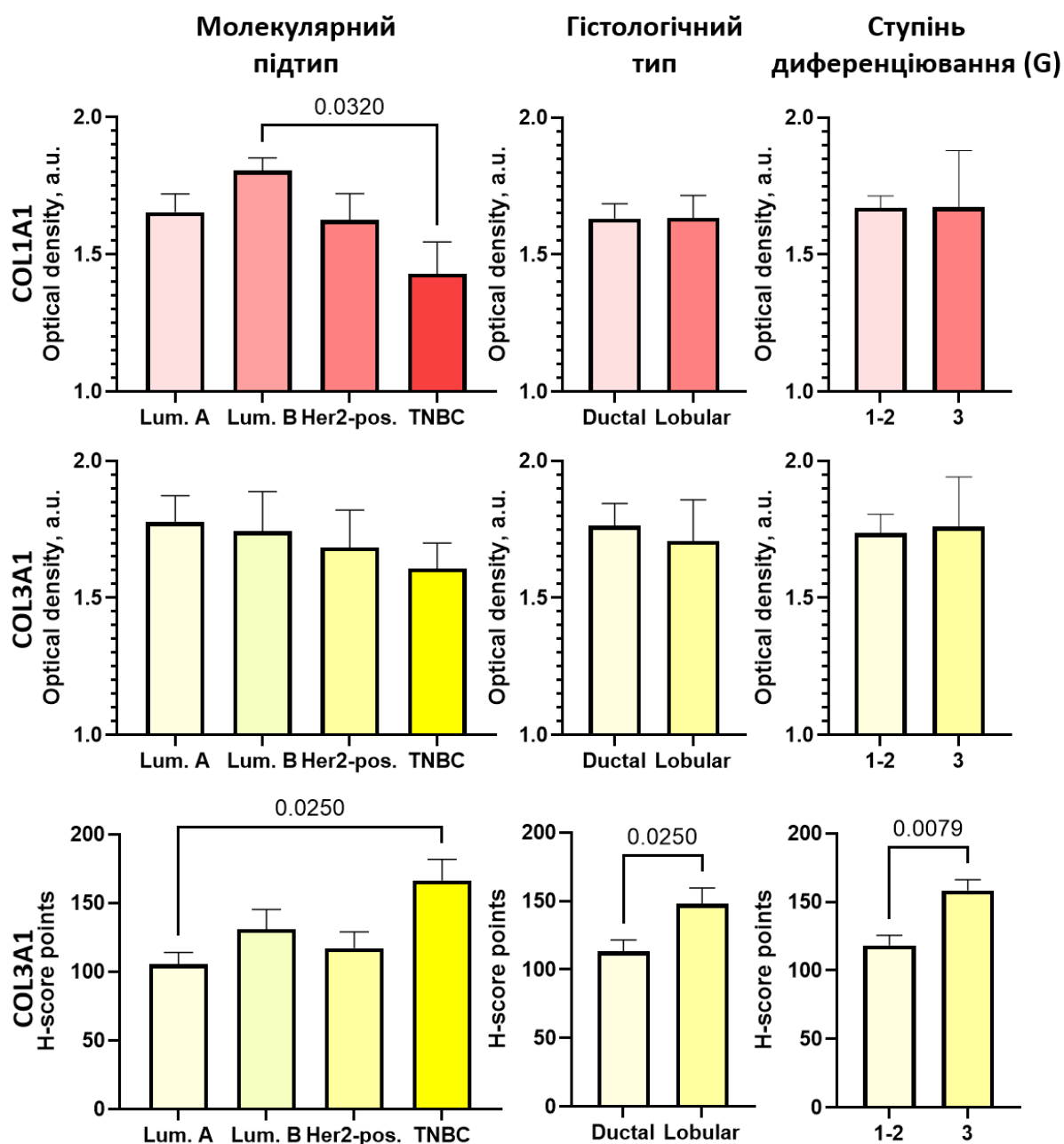


Рис.4.13. Зв'язок показників експресії COL1A1 та COL3A1 у пухлинній тканині з молекулярним підтипом, гістологічним типом та ступенем диференціювання у тканині хворих на РМЗ

Варто зазначити, що оптична щільність як COL1A1, так і COL3A1 у стромі пухлин, позитивних за експресією естрогенового рецептора (ER) була на 35,1% ($p < 0,05$) та 52,1% ($p < 0,05$) нижчою порівняно із тканиною рецептор-негативних новоутворень (рис.4.14.).

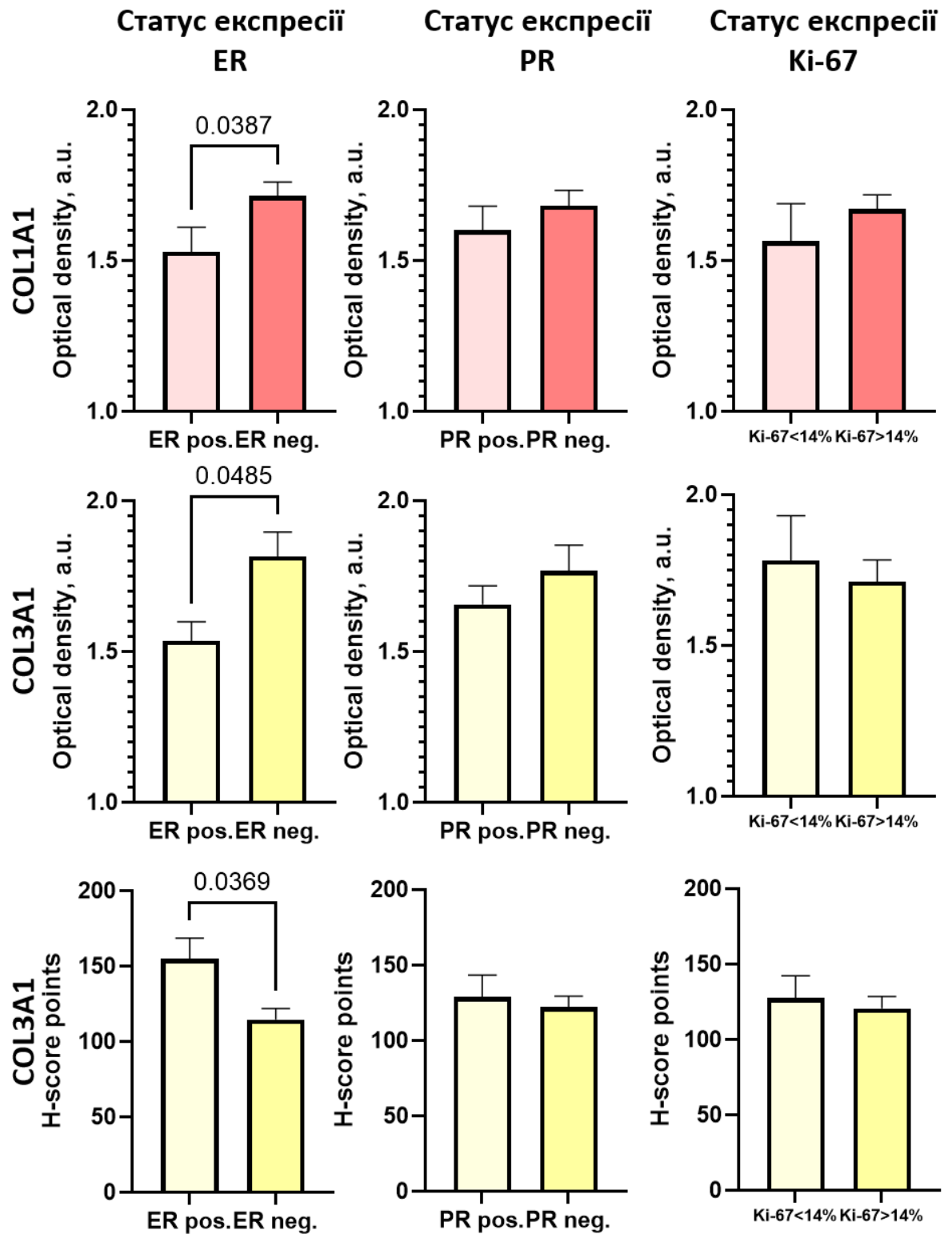


Рис.4.14. Залежність показників експресії COL1A1 та COL3A1 на рівні білка від статусу експресії ER, PR та Ki-67 у тканині PM3

Водночас для клітинної експресії COL3A1 виявлено обернену закономірність: достовірно вищі на 34,9% ($p < 0,05$) рівні цього типу колагену фіксувалися саме в зразках ER-позитивного РМЗ. Підвищена внутрішньоклітинна експресія на фоні зниження стромального вмісту COL3A1 у ER-позитивних клітинах вказує на високу швидкість оновлення матриксу під впливом естрогену.

4.2.1. Оцінка прогностичного та предиктивного значення COL1A1 у тканині хворих на рак молочної залози різних вікових груп.

Враховуючи доведену роль колагену у хворих різних вікових груп, окремим фрагментом дослідження стала оцінка прогностичного значення показників експресії гену *COL1A1* на рівні мРНК та білка у тканині РМЗ хворих різних вікових груп (рис.4.15). Аналіз показників експресії *COL1A1* встановив, що рівень мРНК цього гену у тканині РМЗ жінок до 45 років був у 10,5 разів нижчий ($p < 0,0171$) порівняно із аналогічним показником у пухлинній тканині пацієнток старше 45 років ($0,293 \pm 0,161$ проти $3,057 \pm 1,174$ dCT, відповідно). Навпаки, показник оптичної щільності COL1A1 був на 13% більшим ($p < 0.0001$) у тканині РМЗ хворих молодого віку ($1,514 \pm 0,017$ у.о.) у порівнянні з пацієнтками старшого віку, в яких він дорівнював $1,319 \pm 0,018$ dCT.

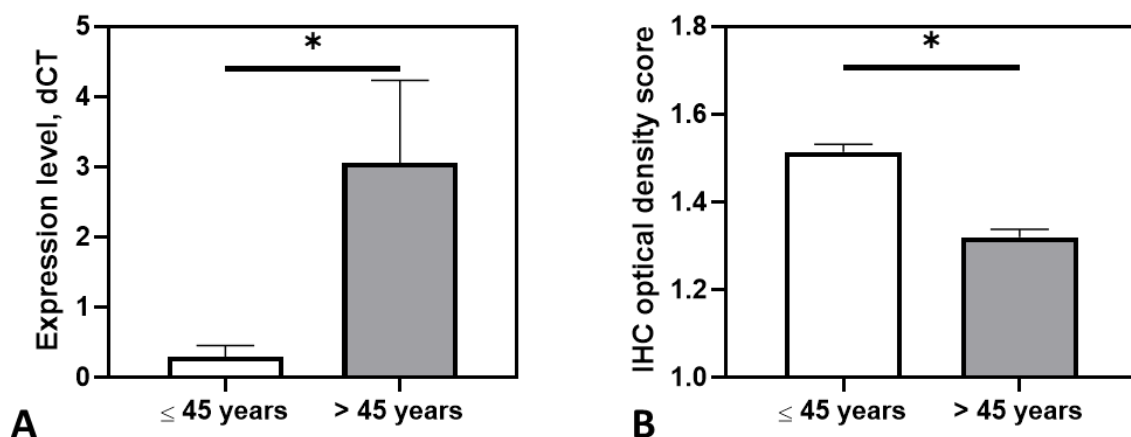


Рис.4.15. Експресія гену *COL1A1* на рівні мРНК (А) та білка (В) у тканині РМЗ пацієнток різних вікових груп

При аналізі зв'язку експресії *COL1A1* із клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу виявлено, що рівні його мРНК у пухлинній тканині не залежить від стадії РМЗ, розміру новоутворень та наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів в обох досліджених вікових групах пацієнток (табл. 4.1.). У групі хворих на РМЗ молодого віку зростання мРНК *COL1A1* у 9,8 разів ($p < 0.004$) зафіксовано у пухлинній тканині, негативній за експресією PR (Me=0.59 dCT) у порівнянні із тканиною РМЗ, позитивною за експресією PR (Me=0.06 dCT). (табл.4.1.).

У пацієнток старшого віку достовірне зростання рівня мРНК *COL1A1* ($p < 0.032$) виявлено у тканині РМЗ люмінального А та Б підтипів (Me=0,17 та Me=2,11 dCT відповідно) порівняно із новоутвореннями Her2/neu - позитивного та базального молекулярних підтипів (Me=6,87 та Me=5,39 dCT відповідно) (табл. 4.1.). Встановлено, що у цій віковій групі хворих рівень експресії мРНК *COL1A1* прямо корелює з експресією PR ($p < 0.043$) та зворотно залежить від наявності ER ($p < 0,036$) у тканині РМЗ (табл. 4.1.).

Таблиця 4.1. Зв'язок експресії *COL1A1* на рівні мРНК із клініко-патологічними та молекулярно-біологічними особливостями хворих на РМЗ різних вікових груп.

		45-						45+					
		Min (dCT)	Q1 (dCT)	Med (dCT)	Q3 (dCT)	Max (dCT)	P	Min (dCT)	Q1 (dCT)	Med (dCT)	Q3 (dCT)	Max (dCT)	P
Stage	I	0.09	0.09	0.22	0.36	0.36	0.582 2	-	-	-	-	-	-
	II	0.02	0.04	0.09	0.22	3.49		0.01	0.03	2.08	15.87	31.52	0.933
	III	0.09	0.09	0.15	0.23	0.23		0.17	0.48	1.37	6.69	7.99	
T stage	1	0.03	0.05	0.09	0.29	0.36	0.996	-	-	-	-	-	-
	2	0.02	0.04	0.16	0.23	3.49		0.01	0.04	2.05	7.99	31.52	0.991
	3	0.09	0.09	0.10	0.10	0.10		0.17	0.17	1.35	5.39	5.39	
N stage	0	0.10	0.12	0.21	0.32	3.49	0.246	0.04	0.54	2.48	24.16	31.52	0.573
	1-3	0.03	0.06	0.145	0.22	0.56		0.03	0.57	2.08	6.33	10.65	
Molecular subtype	Lum A	0.03	0.05	0.12	0.30	0.36	0.995	0.04	0.04	0.17	0.29	0.29	0.032
	Lum B	0.02	0.04	0.13	0.23	3.49		1.37	1.71	2.11	9.32	10.65	
	HER2/n eu	0.09	0.09	0.10	0.19	0.19		6.42	6.42	6.87	7.52	7.52	
	Basal	0.04	0.04	0.13	0.23	0.23		4.39	4.39	5.39	5.89	31.52	

Продовження табл.4.1.

Differentiation grade	2	0.03	0.06	0.15	0.24	0.36	0.751	0.01	0.03	0.77	11.92	31.52	0.328
	3	0.02	0.04	0.09	0.22	3.49		0.79	1.42	2.11	9.32	10.65	
ER expression	positive	0.04	0.09	0.18	0.23	0.23	0.488	6.39	6.39	6.95	7.52	31.52	0.036
	negative	0.02	0.03	0.09	0.23	3.49		0.01	0.10	1.37	3.55	5.65	
PR expression	positive	0.02	0.08	0.59	0.23	3.49	0.004	0.01	0.09	1.37	18.45	31.52	0.043
	negative	0.03	0.03	0.06	0.12	0.22		0.04	0.60	2.08	8.66	10.65	
HER2/neu expression	positive	0.02	0.04	0.09	0.22	3.49	0.807	0.01	0.54	6.38	26.30	31.52	0.412
	negative	0.03	0.04	0.15	0.23	0.36		0.04	0.17	1.37	5.39	7.99	

При аналізі залежності експресії COL1A1 на рівні білка від клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу у групі пацієнток молодого віку встановлено обернений зв'язок показників експресії цього маркера із розміром новоутворень (рис.4.16). Показники оптичної щільності COL1 для новоутворень РМЗ категорії T1, T2, T3 та T4 дорівнювали $1,600 \pm 0,036$, $1,514 \pm 0,021$, $1,361 \pm 0,039$, $1,427 \pm 0,036$ у.о., відповідно.

Достовірне ($p < 0.0163$) зменшення значень оптичної щільності COL1A1 зафіксовано у тканині помірно диференційованого РМЗ ($1,562 \pm 0,025$ у.о.) порівняно із низько диференційованими пухлинами пацієнток молодших за 45 років ($1,482 \pm 0,022$ у.о.).

У групі пацієнток молодого віку зростання оптичної щільності COL1 відзначено ($p < 0.0001$) у тканині люмінального А та Б підтипів РМЗ ($1,652 \pm 0,053$ у.о. та $1,548 \pm 0,023$ у.о. відповідно), у порівнянні з аналогічними показниками у новоутвореннях Her2/neu -позитивного та базального підтипів ($1,447 \pm 0,041$ у.о. та $1,357 \pm 0,030$ у.о. відповідно).

Достовірне збільшення індексу оптичної щільності COL1 ($p < 0.0001$) також відзначено у тканині новоутворень РМЗ хворих молодого віку з позитивним статусом експресії PR, порівняно із аналогічними значеннями у тканині РМЗ з негативним статусом рецепторів цього стероїдного гормону ($1,447 \pm 0,027$ проти $1,564 \pm 0,020$ у.о.).

У пацієнток старше 45 років найменші показники експресії зафіксовано у тканині новоутворень категорії T3 ($1,271 \pm 0,016$ у.о, $p < 0.0001$) та у РМЗ низького ступеня диференціювання ($1,317 \pm 0,016$ у.о, $p < 0.0001$).

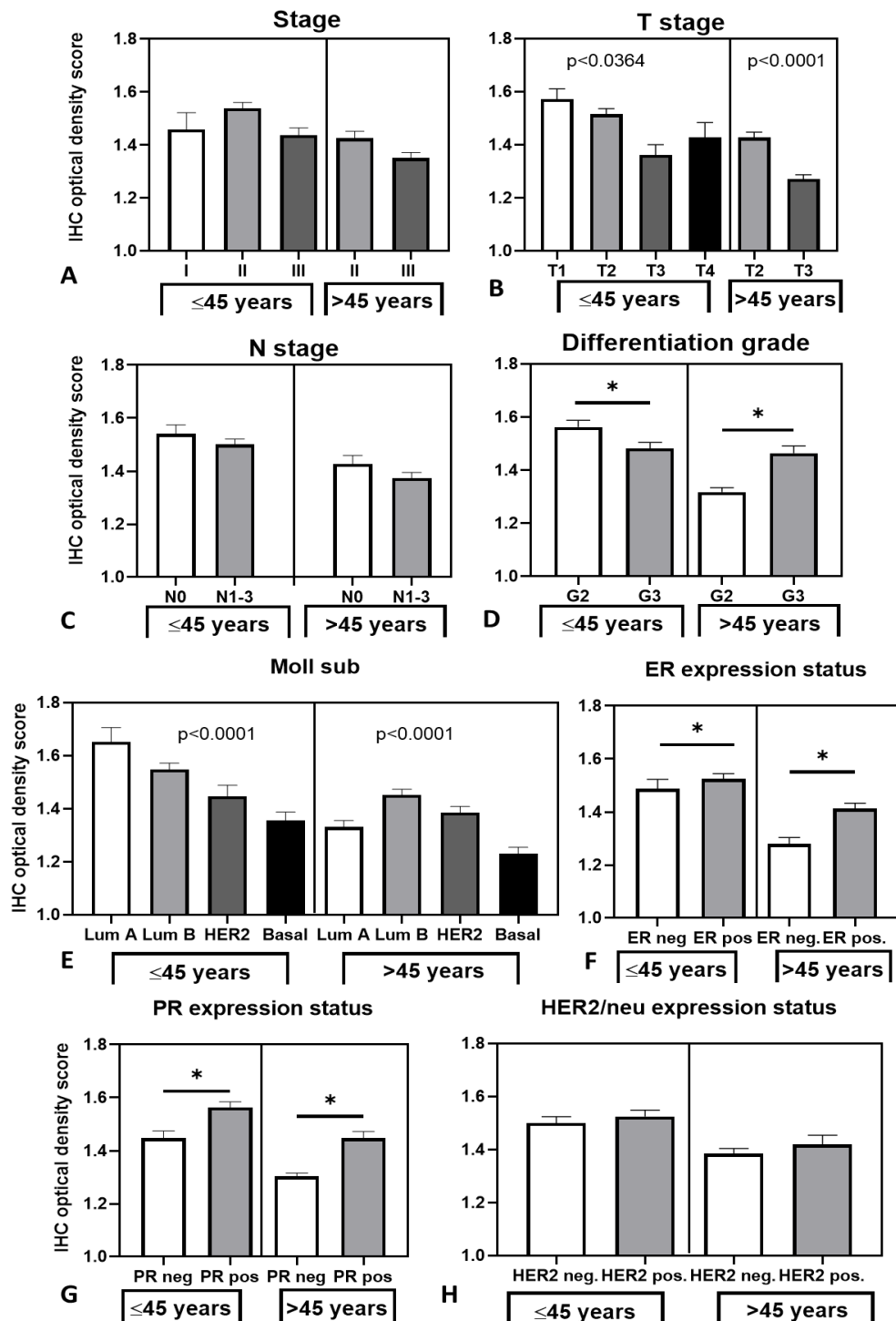


Рис.4.16. Залежність показників експресії *COL1A1* на рівні білка від основних клініко-патологічних характеристик хворих на РМЗ: А – стадії пухлинного процесу; В – розміру новоутворення; С – статусу регіонарних лімфатичних вузлів; D - ступеня диференціювання пухлини; Е – молекулярного підтипу новоутворень; F – статусу експресії ER; G – статусу експресії PR; H – статусу експресії HER2/neu.

Достовірне збільшення ($p < 0.0001$) вмісту COL1 у стромальному компоненті РМЗ пацієнток старших за 45 років також визначалось у новоутвореннях люмінального Б та Her2/neu - позитивного підтипу ($1,452 \pm 0,021$ у.о. та $1,386 \pm 0,022$ у.о.) порівняно з тканиною базального молекулярного підтипу ($1,230 \pm 0,024$ у.о.).

З'ясовано, що рівень експресії COL1 у тканині РМЗ у пацієнток віком старше 45 років прямо залежить від рецепторного статусу новоутворень ($p < 0.0042$ – для ER та $p < 0.0001$ – для PR).

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку показників експресії *COL1A1* на рівні білка та мРНК з показниками агресивності пухлинного процесу, було проаналізовано безрецидивну виживаність хворих на РМЗ різних вікових груп з урахуванням показників експресії зазначених маркерів. Як видно з даних, наведених на рис.4.17, достовірне зниження показників 3-річної безрецидивної виживаності на 35% ($p < 0.0272$) встановлено у пацієнток старших за 45 років з низькими показниками експресії мРНК *COL1A1* у тканині РМЗ.

Встановлено, що 3-річна безрецидивна виживаність пацієнток з РМЗ молодого віку була вищою ($p < 0.0309$) за наявності низького рівня експресії COL1 у пухлинній тканині. Рецидиви захворювання у групі хворих молодших за 45 років із низькою експресією COL1 у тканині РМЗ визначалися у 32% випадків.

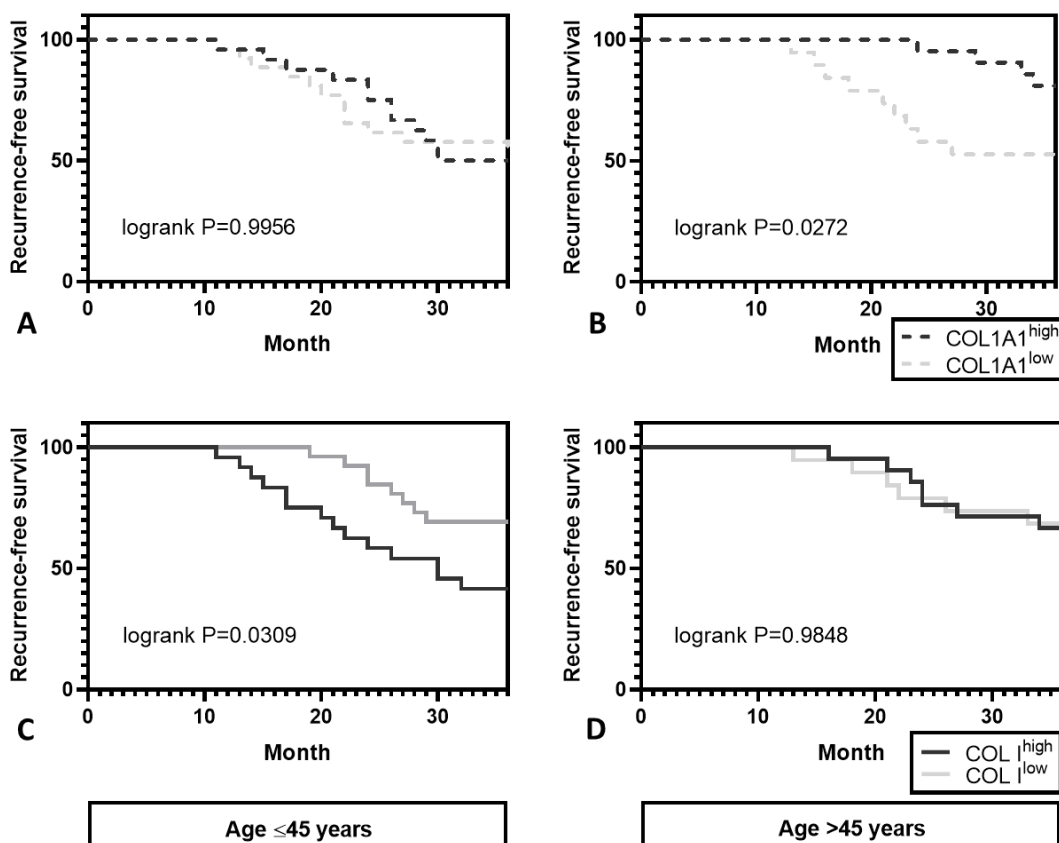


Рис.4.17. Безрецидивна виживаність хворих на РМЗ різних вікових груп залежно від експресії *COL1A1* на рівні мРНК (A-B) та білка (C-D)

Таким чином, в ході дослідження нами були ідентифіковані особливості експресії *COL1A1* на рівні мРНК та білка у тканині РМЗ пацієнток різних вікових груп. Найбільші показники експресії *COL1A1* на рівні мРНК та білка зафіксовано у тканині обох люмінальних підтипів РМЗ порівняно із новоутвореннями HER2/неу-позитивного та базального молекулярного підтипу. З'ясовано, що експресія COL1 на рівні білка зворотно пов'язана із віком хворих та стадією РМЗ, а також асоціюється з низькими показниками виживаності хворих.

4.3. Профіль експресії MMP-1 та MMP-8 у тканині РМЗ хворих з різним клінічним статусом

В ході дослідження *ex vivo* на клінічному матеріалі найбільшу експресію MMP-1 зафіксовано у тканині РМЗ II стадії ($183,2 \pm 12,85$ балів H-score) порівняно із тканиною новоутворень I стадії ($129,1 \pm 19,03$ балів H-score) пухлинного процесу (рис.4.18).

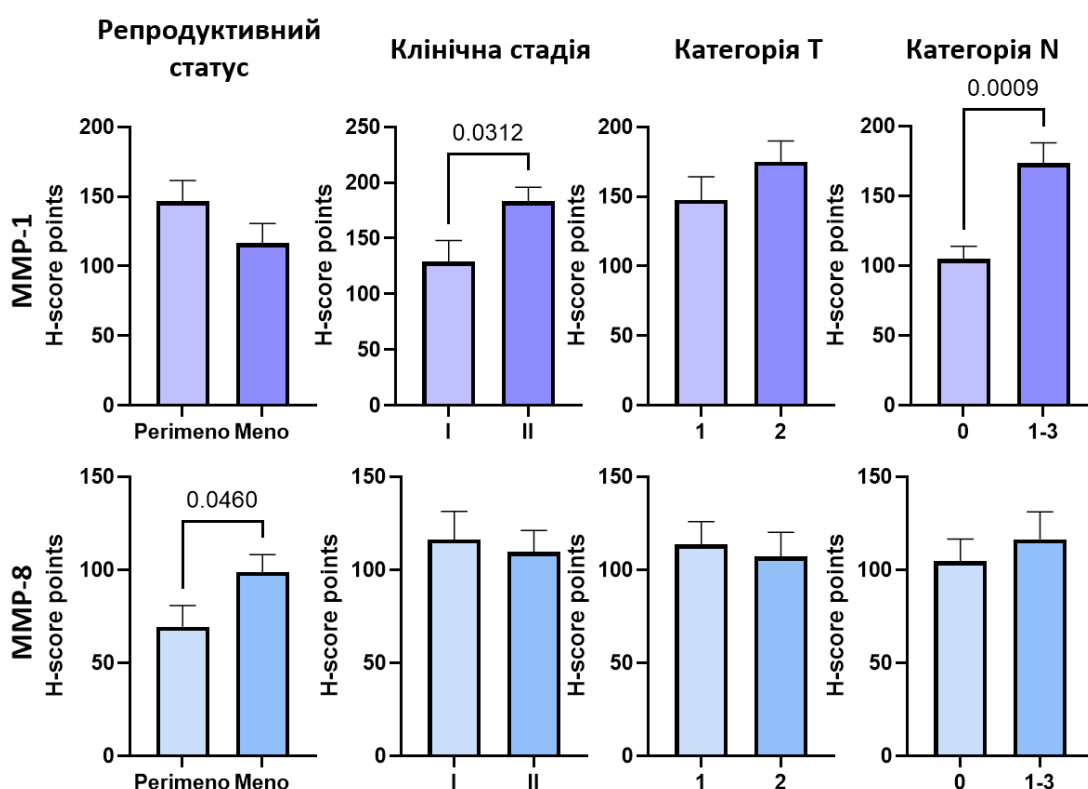


Рис.4.18. Зв'язок показників експресії MMP-1 та MMP-8 у пухлинній тканині з репродуктивним статусом, стадією, розміром новоутворень (категорія T) та статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N) хворих на РМЗ

Не виявлено зв'язку показників експресії MMP-8 зі стадією РМЗ. У тканині РМЗ I та II стадії показники експресії колагенази II типу становили відповідно $116,3 \pm 15,21$ та $109,6 \pm 11,59$ балів H-score. Варто зазначити, що

менопаузальний статус пацієнок із РМЗ асоціюється із статистичним збільшення експресії MMP-8 на 42,14% ($p < 0,05$) порівняно із пухлинною тканиною пацієнок у перименопаузі.

Показано, що тканина низькодиференційованого РМЗ характеризується збільшенням на 59,2% та 96,6% відповідно показників експресії MMP-1 та MMP-8 (рис.4.19). Достовірне зростання рівнів MMP-1 на фоні зниження показників експресії MMP-8 зафіксовано у тканині долькової аденокарциноми порівняно із РМЗ протокової будови (на 42,3% та 80,0% відповідно) (рис.4.19). Встановлено, що характерною ознакою люмінальних А та Б молекулярних підтипів РМЗ є висока експресія MMP-1 ($p = 0,0240$) та MMP-8 ($p = 0,0239$) порівняно із тканиною HER2/neu-позитивних та тричі негативних молекулярних підтипів (рис.4.19).

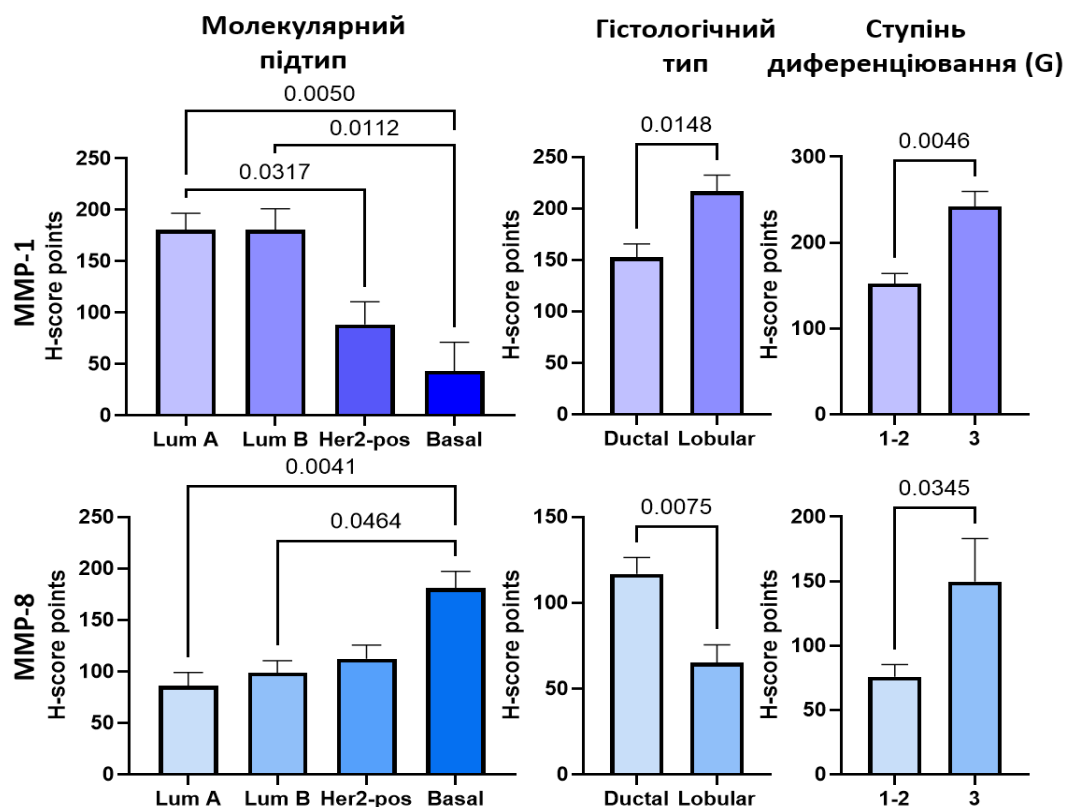


Рис.4.19. Зв'язок показників експресії MMP-1 та MMP-8 у пухлинній тканині з молекулярним підтипом, гістологічним типом та ступенем диференціювання у тканині хворих на РМЗ

Отримані нами результати доводять існування оберненої залежності експресії MMP-1 від рецепторного статусу новоутворення. У ER-позитивних та PR-позитивних пухлинах молочної залози виявлено підвищення рівня MMP-1 на 89,0% та 67,4% у порівнянні із тканиною рецептор-негативного РМЗ (рис.4.20).

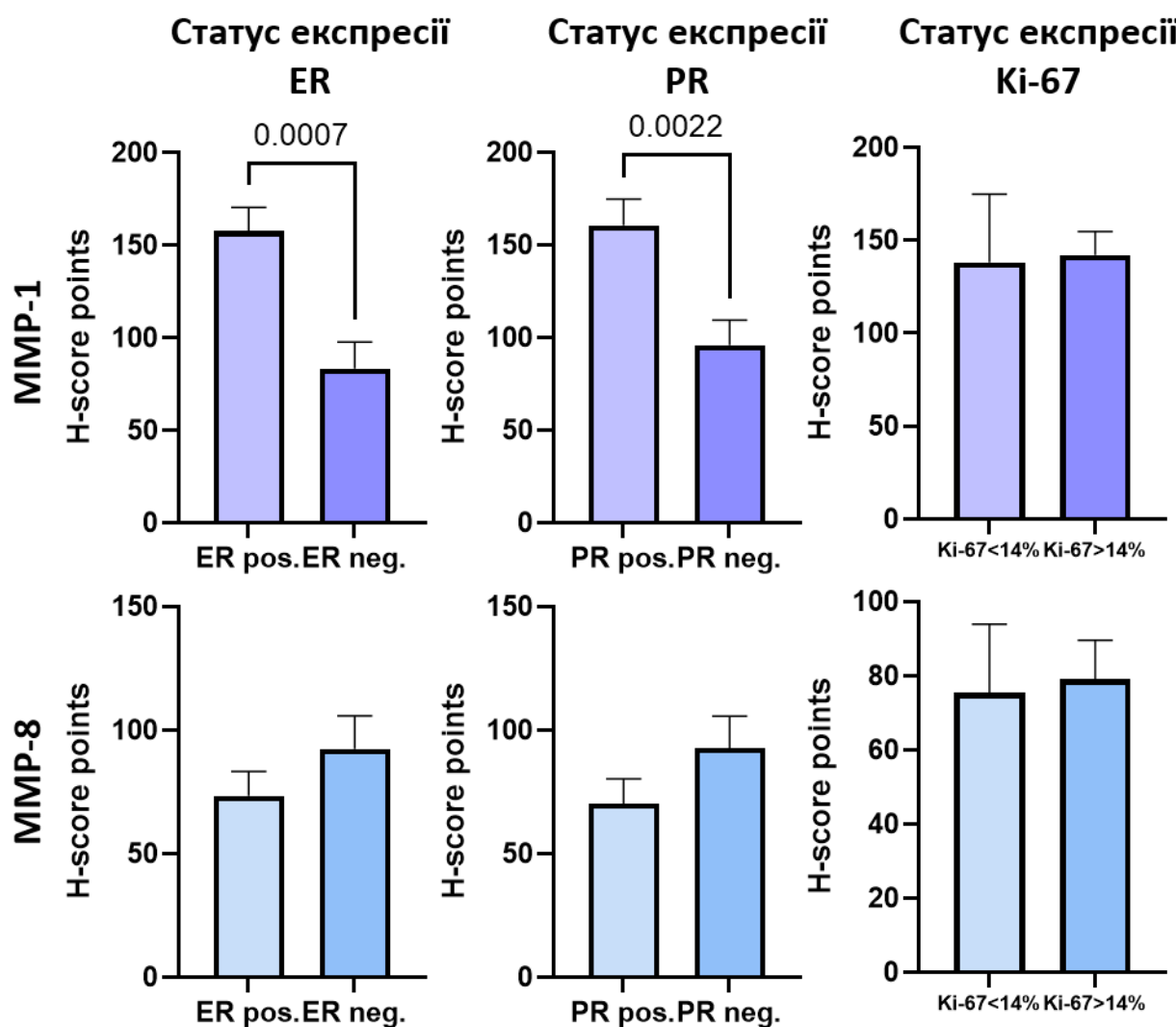


Рис.4.20. Залежність показників експресії MMP-1 та MMP-8 на рівні білка від статусу експресії ER, PR та Ki-67 у тканині хворих на РМЗ.

Ідентифікований зв'язок експресії генів ремоделювання стромального мікрооточення з такими показниками злоякісності РМЗ, як стадія пухлинного процесу, ступінь диференціювання, гістологічний тип та молекулярний

підтип, вказує на перспективність їх використання як прогностичних маркери.

4.4. Зв'язок експресії TIMP-3 від клініко-патологічних та молекулярно-біологічних особливостей РМЗ.

Наступним етапом дослідження стала оцінка показників експресії тканинного інгібітора TIMP3, який залучений до регуляції функціональної активності MMP-1 та MMP-8. Показано, що із настанням менопаузи експресія цього білка у тканині РМЗ знижується на 41,5% ($p < 0,05$) порівняно із зразками пухлинної тканини пацієток, репродуктивна функція яких зберігається (рис.4.21.). Крім того, збільшення розміру новоутворення також асоціюється із зниженням експресії TIMP3 на 65,6% ($p < 0,05$). Варто зазначити, що достовірно меншу експресію TIMP3 зафіксовано у тканині РМЗ люмінального А молекулярного підтипу – 51,34 бала H-score, що в 3,01 ($p < 0,05$) та 3,17 ($p < 0,05$) разів нижче порівняно із зразками новоутворень люмінального Б та потрійно негативного молекулярного підтипу (рис.4.22.).



Рис.4.21. Зв'язок показників експресії TIMP3 у пухлинній тканині з репродуктивним статусом, стадією, розміром новоутворень (категорія Т) та статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N) у тканині хворих на РМЗ

Зниження експресії TIMP3 асоціюється із статусом ER. Доведено, що рецептор позитивні пухлини характеризувалися на 78,0 % вищими ($p<0,05$) рівнями експресії цього білка порівняно із тканиною PMЗ, негативною за ER (рис.4.23.).

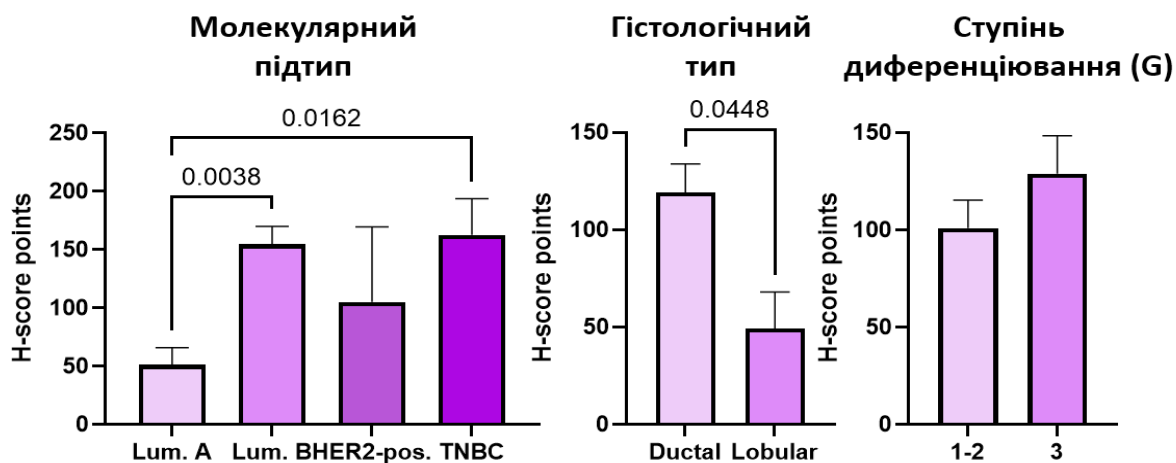


Рис.4.22. Зв'язок показників експресії TIMP3 у пухлинній тканині з молекулярним підтипом, гістологічним типом та ступенем диференціювання у тканині хворих на РМЗ

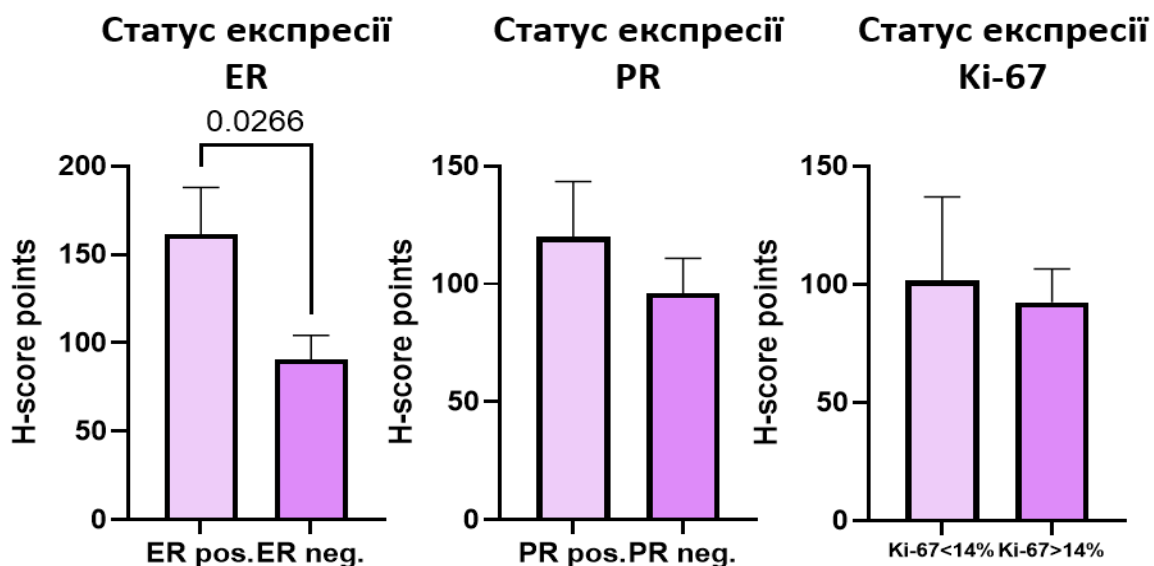


Рис.4.23. Залежність показників експресії TIMP3 на рівні білка від статусу експресії ER, PR та Ki-67 у тканині хворих на РМЗ

Таким чином, показники експресії TIMP3 асоціюються із збереженим репродуктивним статусом пацієнток, позитивною експресією ER та агресивними люмінальним Б та базальним молекулярними підтипами РМЗ, що робить його перспективним молекулярним маркером, особливо для хворих пременопаузального віку.

4.5. Клінічне значення експресії LOX у тканині РМЗ різного ступеня злоякісності.

За результатами гістохімічного дослідження показано, що експресія LOX асоціюється із збільшенням категорій Т та N за класифікацією TNM (рис.4.24.). Пухлинна тканина новоутворень більшого розміру (категорія T2) із діагностованим ураженням регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N1-3) характеризувалася на 74,18% ($p<0,05$) та 57,80% ($p<0,05$) вищими показниками експресії цього крослінкінг-протеїну порівняно із зразками РМЗ категорія T1 та N0.

Варто зазначити, що найменші показники експресії LOX – лише 13,81 бала H-score – зафіксовано у тканині РМЗ потрійно негативного молекулярного підтипу, що на 7,23 ($p<0,05$) та 7,03 ($p<0,05$) нижче порівняно із зразками новоутворень люмінального А та Б молекулярних підтипів відповідно (рис.4.25.). Окрім того, зниження ступеня диференціювання (G3) пов'язане із достовірним збільшенням експресії LOX в 2,05 рази ($p<0,05$) у порівнянні із аналогічними показниками в тканині високо- чи помірно диференційованого РМЗ.

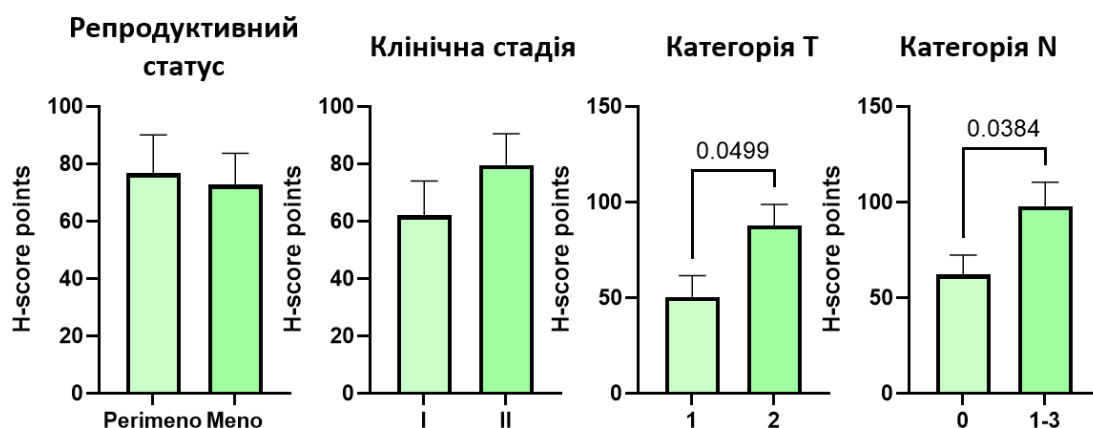


Рис.4.24. Зв'язок показників експресії LOX у пухлинній тканині з репродуктивним статусом, стадією, розміром новоутворень (категорія Т) та статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N) у тканині хворих на РМЗ

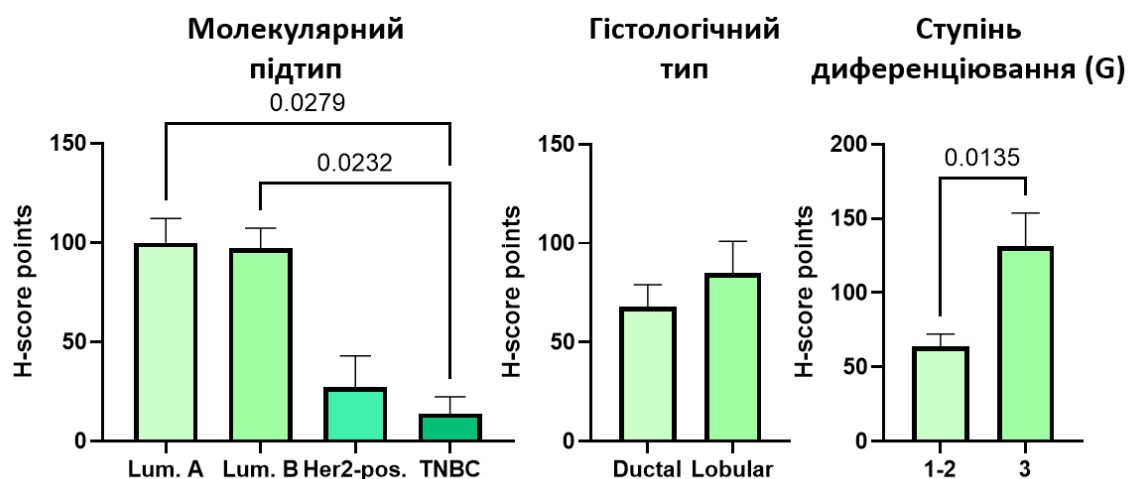


Рис.4.25. Зв'язок показників експресії LOX у пухлинній тканині з молекулярним підтипом, гістологічним типом та ступенем диференціювання у тканині хворих на РМЗ

Окремої уваги потребує встановлений нами зв'язок рівнів LOX у тканині РМЗ із молекулярним профілем новоутворень (рис.4.26.). Статистично значуще зростання експресії цього білка у відповідно 2,71 ($p<0,05$), 1,55 ($p<0,05$) та 3,01($p<0,05$) разів зафіксовано у тканині ER- та PR-

позитивних новоутворень із високим проліферативним потенціалом (Ki-67>14%).

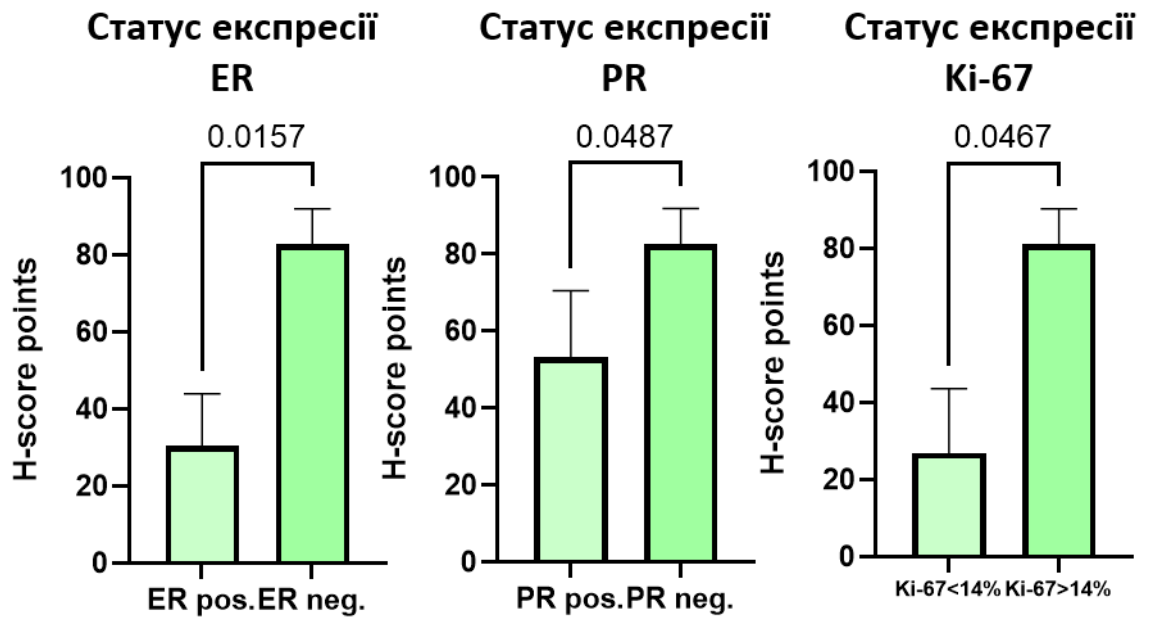


Рис.4.26. Залежність показників експресії LOX на рівні білка від статусу експресії ER, PR та Ki-67 у тканині хворих на РМЗ

Таким чином, ідентифікована пряма залежність експресії LOX від розміру новоутворень та статусу ураження регіонарних лімфатичних вузлів, а також обернений зв'язок його рівнів від статусу ER, PR та Ki-67 дозволяють із впевненістю стверджувати про активну участь у формуванні ступеня злоякісності первинного осередка пухлини, а також доводять високий прогностичний потенціал цієї молекули при лікуванні хворих на злоякісні новоутворення молочної залози.

4.6. Молекулярний профіль колагенової стромы пухлин із різним метастатичним статусом

Дослідження експресії COL1A1 та MMP-1 дозволило оцінити особливості реорганізації позаклітинного матриксу у первинному осередку РМЗ та регіонарних лімфатичних вузлів. У первинній пухлині виявлено високий рівень відкладення колагену в стромі. Його волокна формували архітектоніку з грубих, чітко структурованих пучків, які щільно оточували та ізолювали окремі тубулярні структури, пухлинні тяжі й гнізда. Масивний дифузний розподіл сполучнотканинних елементів на більшій частині площі зрізу вказував на значну десмопластичну відповідь тканин. Основна локалізація колагенових структур фіксувалася в інтерстиції та навколо пухлинних комплексів у вигляді щільних прошарків, що підтверджує процеси інтенсивної перебудови матриксу безпосередньо в зоні первинного неопластичного росту.

Натомість у метастатично змінених лімфатичних вузлах архітектоніка колагенового компонента мала переважно вогнищевий та гетерогенний характер. Окремі тяжі та пучки волокон виявлялися переважно периваскулярно або по периферії пухлинних конгломератів, тоді як великі зони малігнізованої тканини характеризувалися слабким розвитком сполучнотканинної стромы. Порівняно з первинною пухлиною, загальна площа колагенових структур у метастазах була меншою, а їхнє просторове розташування — хаотичнішим. Така картина відображає специфіку строמוутворення та формування нового пухлинного мікрооточення в лімфоїдній тканині.

Нами було проаналізовано показники оптичної щільності COL1A1 у малігнізованій тканині молочної залози пацієнток із різним метастатичним статусом. Рівень оптичної щільності в умовно нормальній тканині складав

$1,322 \pm 0,064$ у.о. У пухлинній тканині хворих без метастазів у лімфатичних вузлах групи N0 PMЗ цей показник достовірно зростав на 35,7% і становив $1,794 \pm 0,062$ у.о. Натомість у пацієток із наявністю регіонарних метастазів групи N1-3 PMЗ спостерігалось статистично значуще зниження цього показника порівняно з групою N0 PMЗ на 17,71% до рівня $1,524 \pm 0,039$ у.о. Водночас, тканина PMЗ категорії M1 характеризувалася достовірно найнижчими показниками експресії колагену 1 типу та була на 29,7% та 10,2% нижчою порівняно із PMЗ категорій N0 та N1-3 відповідно.

Додатково нами було проведено оцінку оптичної щільності COL1A1 у тканині лімфатичних вузлів. В умовно нормальних лімфатичних вузлах цей показник складав $1,202 \pm 0,047$ у.о. У тканині метастатично уражених регіонарних лімфатичних вузлів спостерігалось його статистично значуще зростання на до $1,503 \pm 0,039$ у.о. (Рис. 4.27).

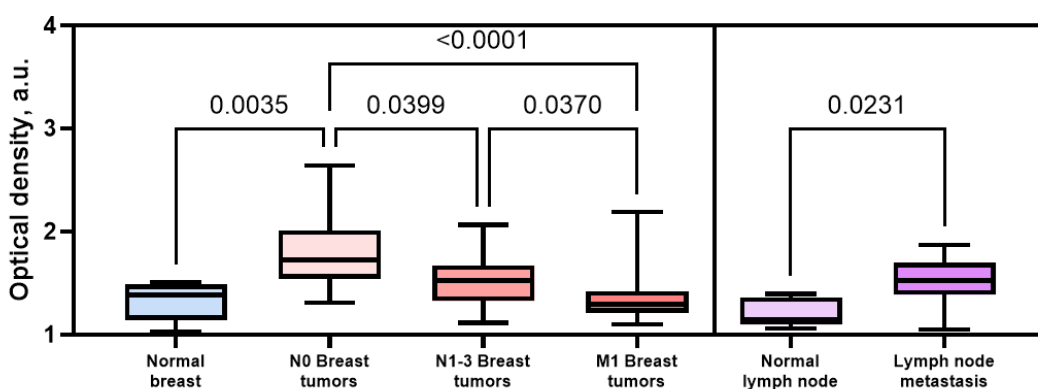


Рис. 4.27. Оптична щільність COL1A1 у тканині PMЗ хворих із різним метастатичним статусом, а також у тканині метастатично уражених регіонарних лімфатичних вузлів

Показано, що рівень експресії MMP-1 в умовно нормальній тканині молочної залози складав $18,33 \pm 3,21$ бала. У пухлинній тканині хворих категорії N0 цей показник становив $105,0 \pm 8,89$ бала. Водночас у пацієток

із наявністю регіонарних метастазів групи N1–3 РМЗ рівень експресії був найвищим і сягав $173,5 \pm 14,61$ бала.

Аналіз цих даних демонструє статистично значуще зростання експресії ММР-1 при ураженні регіонарних лімфатичних вузлів. Рівень маркера у пухлинах групи N1–3 РМЗ був у 9,5 раза достовірно вищим порівняно з умовно нормальною тканиною молочної залози та в 1,7 раза вищим без зафіксованої статистичної значущості порівняно з пухлинами без метастазів групи N0 РМЗ.

Варто зазначити, що в умовно нормальній тканині лімфатичних вузлів експресія цієї колагенази була повністю відсутня. Натомість у тканині метастатично уражених регіонарних лімфатичних вузлів спостерігався високий рівень експресії, що становив $177,7 \pm 16,58$ бала (рис. 4.28.).

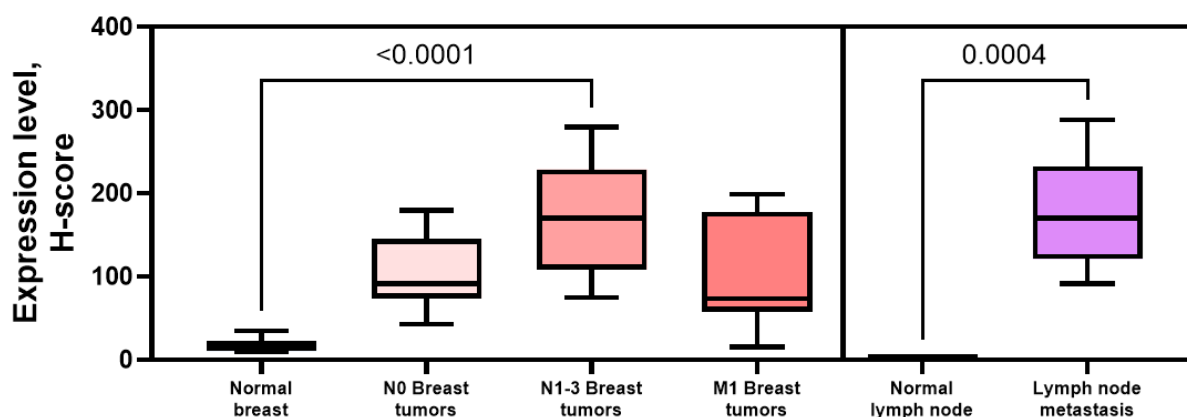


Рис. 4.28. Експресія ММР-1 у тканині РМЗ хворих із різним метастатичним статусом, а також у тканині метастатично уражених регіонарних лімфатичних вузлів

Доведено, що достовірно найвищі показники експресії ММР-1 асоціювалися із маніфестацією пухлинного процесу до легенів. У тканині РМЗ із віддаленими метастазами до печінки та кісткової тканини експресія цього білка була в 2,22 ($p < 0,05$) та 2,76 ($p < 0,05$) меншою порівняно із

тканиною новоутворень із діагностованим поширенням пухлинного процесу до тканини легенів. В той же час, тканина новоутворень із метастазами до легенів характеризувалася на 15,69% ($p < 0,05$) та 21,91% ($p < 0,05$) вищими рівнями оптичної щільності COL1A1 порівняно із аналогічними показниками в зразках РМЗ із поширенням пухлинного процесу до печінки та кісткової тканини (рис.4.29).

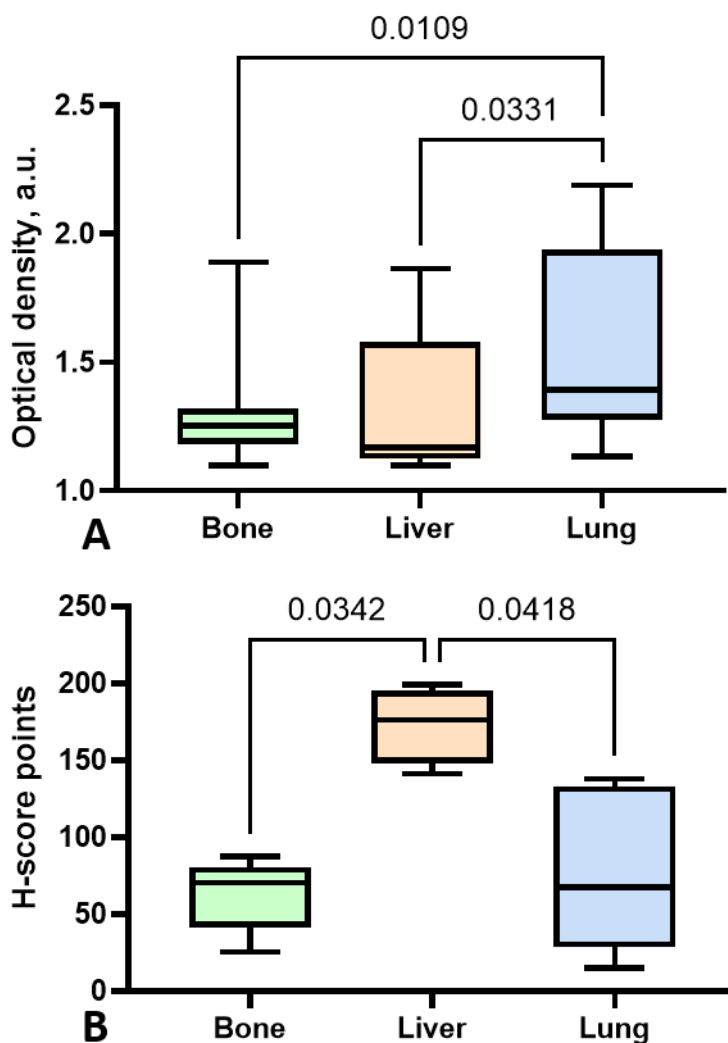


Рис. 4.29. Експресія COL1A1 та MMP-1 у тканині РМЗ залежно від сайтів віддаленого метастазування

Таким чином, розвиток пухлинного процесу у молочній залозі супроводжується підвищенням експресії COL1A1 та MMP-1, тоді як при

прогресуванні захворювання кількість колагену 1 типу починає знижуватися на фоні продовження зростання експресії MMP-1.

Результати проведених досліджень в розділі 4 опубліковано у [129, 131, 132, 135, 136].

РОЗДІЛ 5. ОСОБЛИВОСТІ ЕПІГЕНЕТИЧНОЇ РЕГУЛЯЦІЇ ГЕНІВ КОЛАГЕНІВ ТА БІЛКІВ РЕМОДЕЛЮВАННЯ СТРОМАЛЬНОГО КОМПОНЕНТУ ПУХЛИННОГО МІКРООТОЧЕННЯ У ТКАНИНІ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

5.1. Ідентифікація потенційних мікроРНК-регуляторів пухлинного мікрооточення в системі *in silico*

Для ідентифікації диференційно експресованих мікроРНК у стромі умовно нормальної молочної залози та зразках РМЗ нами використано 4 датасети із бази даних Gene Expression Omnibus (GEO) Національного центру біотехнологічної інформації. Використовуючи датасет GSE37963, нами ідентифіковано 64 диференційно експресовані мікроРНК, тоді як аналіз датасету GSE154255 дозволив ідентифікувати 28 мікроРНК. Дослідження із використанням даних датасетів GSE45666 та GSE26659 дозволило ідентифікувати відповідно 134 та 4 мікроРНК, які диференційно експресуються у стромі РМЗ порівняно із стромою умовно здорової молочної залози (рис.5.1.). Варто зазначити, що зразки у всіх 4 датасетах формували умовні кластери на UMAP plots, що свідчить про певні відмінності у загальному профілі експресії мікроРНК, показники яких було досліджено. Варто зазначити, що у датасетах GSE45666 та GSE26659 до уваги дослідників було взято також і мікроРНК вірусів, які є патогенами людини. Аналіз даних дозволив визначити мікроРНК kshv-miR-K12-3-5p, що має походження від вірусу саркоми Капоші людини.

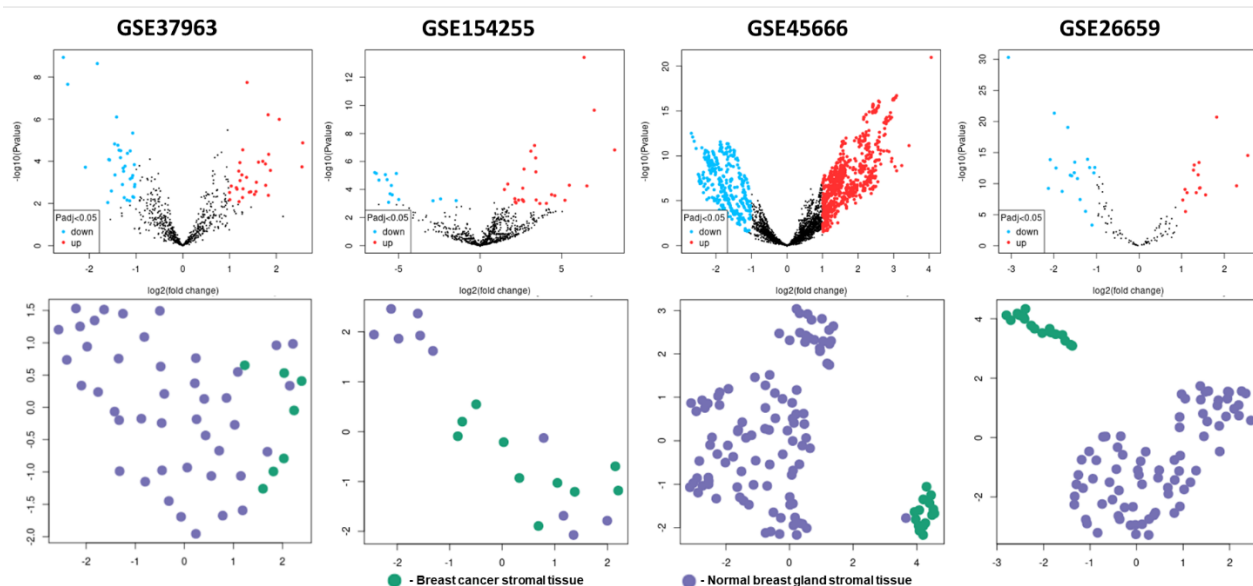


Рис.5.1. Диференційно експресовані мікроРНК у тканині РМЗ порівняно із умовно нормальною тканиною молочної залози. Volcano plots, що відображають диференційно експресовані мікроРНК у обраних для аналізу датасетах (А), червоні та сині точки позначають мікроРНК, експресія яких зростає та знижується, відповідно; UMAP plots, що зображають розміщення у 2D просторі зразків у вибірці кожного датасету на основі показників експресії набору мікроРНК, рівні експресії яких визначали у дослідженні (В).

На рис.5.2 зображена діаграма Венна, яка демонструє кількість мікроРНК, зміни експресії яких були спільними для двох, трьох чи чотирьох датасетів одночасно. Встановлено, що спільними для 2 датасетів було ідентифіковано 40 мікроРНК. В той час як диференційно експресовані мікроРНК, що були спільними одразу для 3 та 4 датасетів, становили 10 та 6 відповідно. В подальшому у дослідженні нами було використано мікроРНК, які диференційно експресувалися як мінімум у 3 датасетах одразу, перелік яких можна побачити на рис.5.2.

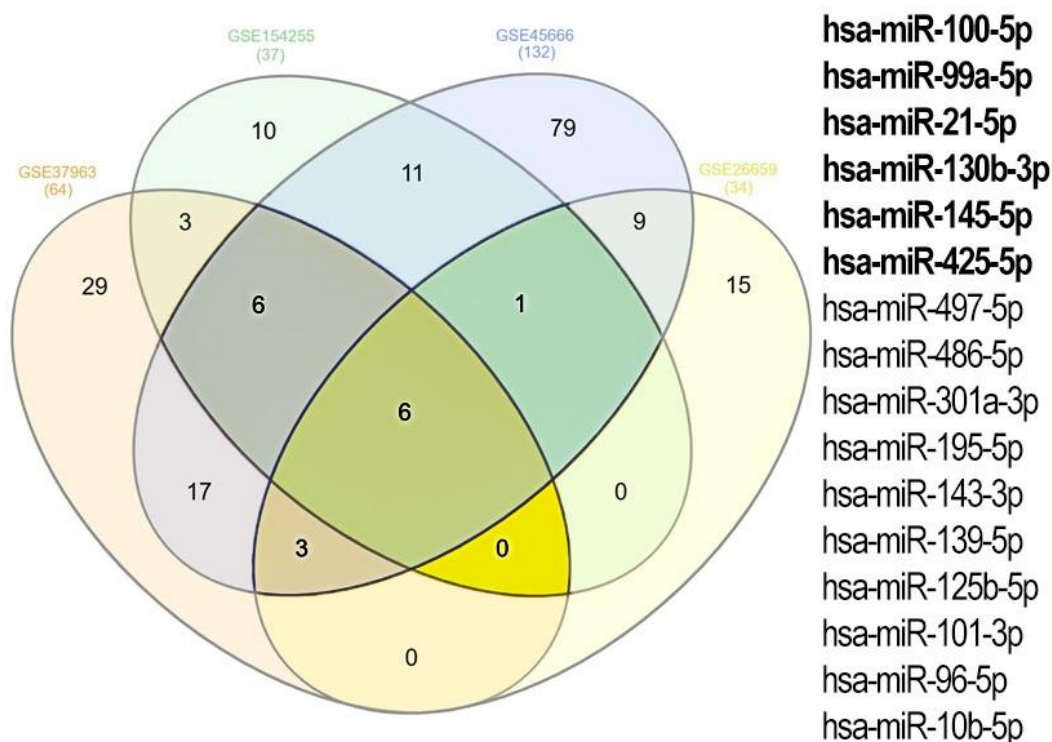


Рис.5.2. Діаграма Вена, що відображає диференційно експресовані мікроРНК, спільні одночасно для кількох досліджуваних датасетів. Представлено 16 мікроРНК, які були спільними мінімум для 3 датасетів, тоді як 6 із них диференційно експресувалися одразу в 4 досліджених датасетах одночасно.

Надалі нами було проведено ідентифікацію диференційно експресованих генів, асоційованих із пухлинною строною, із використанням датасетів GSE26910, GSE10797 та GSE14548 у базі даних GO2. Відповідно до результатів, отриманих при аналізі даних із 3 датасетів (GSE26910, GSE10797 та GSE14548), нами ідентифіковано 1004 гени, експресія яких у стромі РМЗ достовірно відрізняється від аналогічних показників у стромі умовно здорової молочної залози (рис.5.3.).

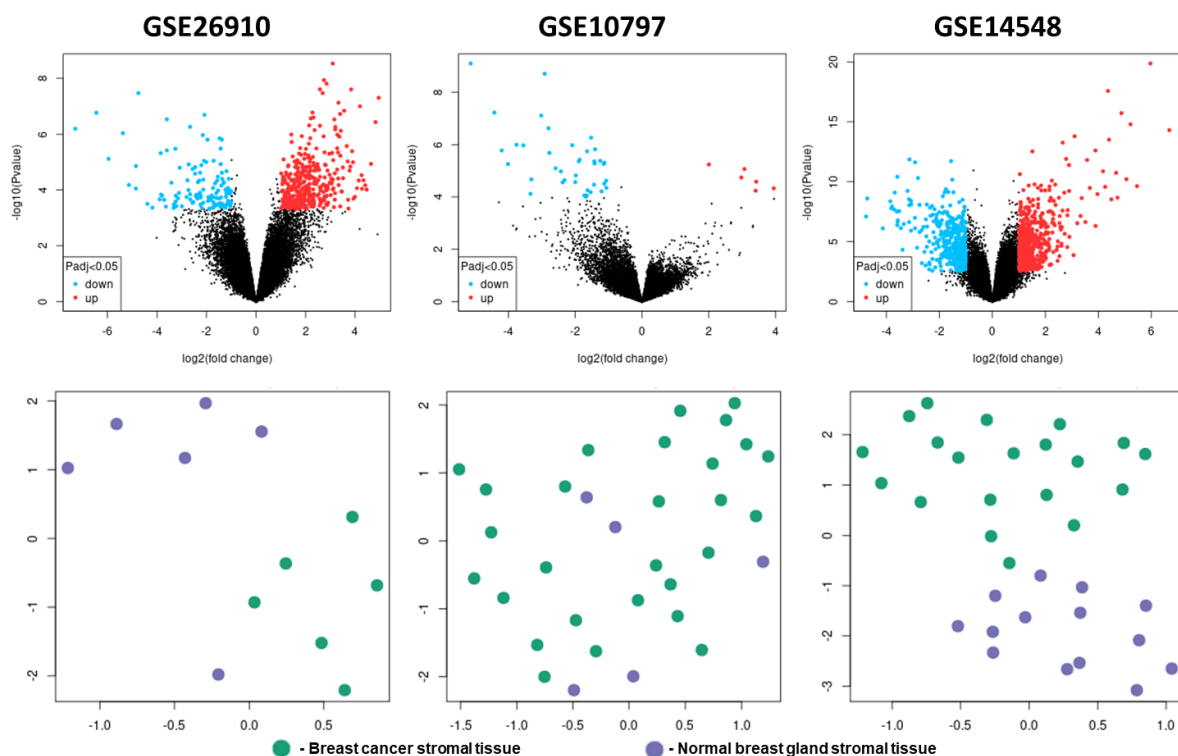


Рис.5.3. Диференційно експресовані гени у тканині стромі РМЗ порівняно із тканиною стромі умовно нормальної молочної залози. Volcano plots, що відображають диференційно експресовані гени у обраних для аналізу датасетах (А), червоні та сині точки позначають гени, експресія яких зростає та знижується, відповідно; UMAP plots, що зображають розміщення 2D просторі зразків у вибірці кожного датасету на основі показників експресії набору генів, рівні експресії яких визначали у дослідженні (В).

Подальше зіставлення ідентифікованих генів пухлинної стромі РМЗ та генів-мішеней досліджуваного профілю мікроРНК показало, що серед загальної кількості таргетних генів 228 диференційно експресувалися при розвитку РМЗ у пухлинній стромі (рис.5.4.).

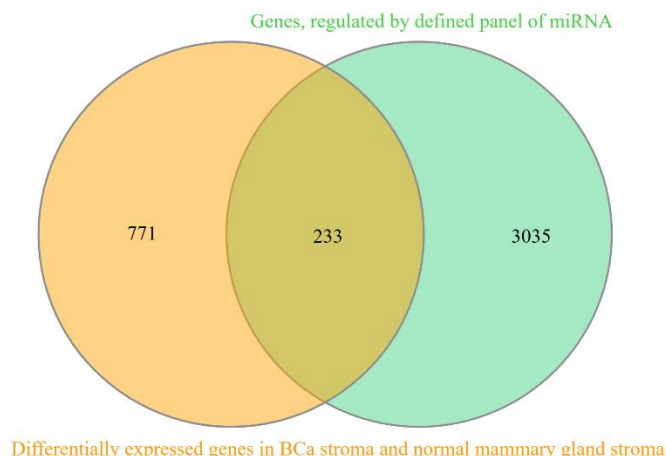


Рис.5.4. Діаграма Вена, що відображає диференційно експресовані гени строми РМЗ, у регуляцію яких залучена ідентифікована панель мікроРНК

Варто зазначити, що серед отриманого переліку диференційно експресованих мікроРНК, найбільший інтерес для нашого подальшого дослідження становитимуть саме hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-142-3p та hsa-miR-143-3p, оскільки вони залучені до регуляції генів колагенової матриці та ремоделювання строми РМЗ (табл. 5.1.).

Таблиця 5.1.

Ідентифіковані мікроРНК, залучені до регуляції досліджуваних генів ремоделювання стромального мікрооточення

	COL1A1	COL3A1	MMP-1	MMP-8	TIMP3	LOX
hsa-miR-26b-5p						
hsa-miR-100-5p						
hsa-miR-142-3p						
hsa-miR-143-3p						

Наступним етапом дослідження стала оцінка діагностичного та прогностичного значення відібраних мікроРНК у хворих на РМЗ. Згідно з даними у базі UALCAN, розвиток РМЗ супроводжується статистично значущим зниженням рівнів мікроРНК-26b-5p, мікроРНК-100-5p та мікроРНК-143-3p у 1,33 ($p<0,05$), 4,16 ($p<0,05$) та 2,44 ($p<0,05$) разів відповідно на фоні підвищення експресії мікроРНК-142-3p у 2,85 ($p<0,05$) разів. Такі зміни перш за все можуть свідчити про послаблення процесів інгібування експресії генів ремоделювання пухлинної стромы із одночасним зростанням контролю експресії генів-регуляторів ремоделювання колагенового матриксу (рис.5.5.).

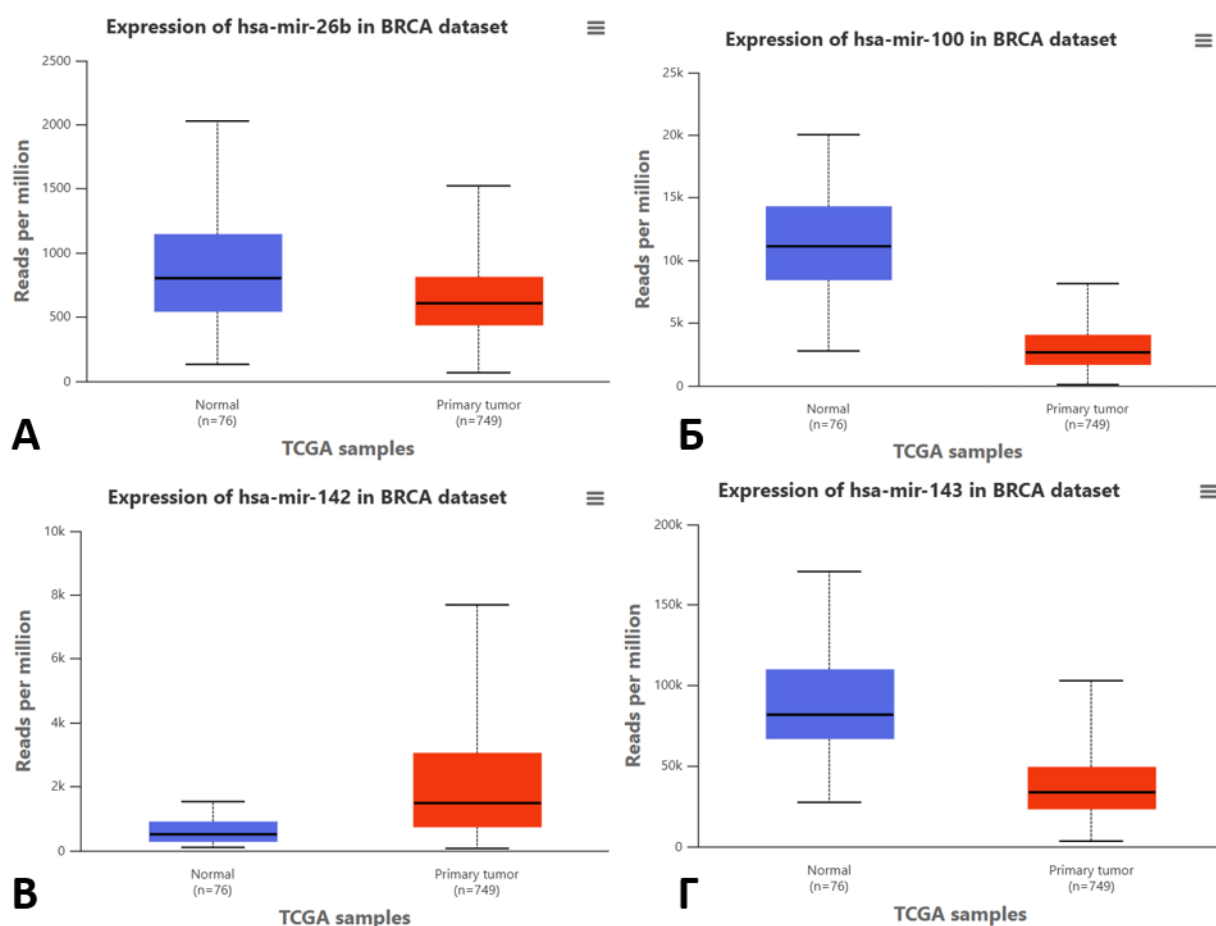


Рис. 5.5. Експресія ідентифікованих мікроРНК у немалігнізований та злоякісно трансформованій тканині молочної залози

При аналізі зв'язку експресії досліджуваних мікроРНК із клінічним статусом хворих показано, що тканина РМЗ 4 стадії характеризується статистичним зниженням на 9,20% ($p < 0,05$) рівнями мікроРНК-26b-5p порівняно із зразками пухлин 1 стадії. Крім того, зразки новоутворень HER2/neu-позитивного підтипу РМЗ мали на 21,14% ($p < 0,05$) та 15,73% ($p < 0,05$) менші рівні цієї мікроРНК порівняно із тканиною люмінальних, а також потрійнонегативних молекулярних підтипів відповідно. Залежності експресії мікроРНК-26b-5p від стадії пухлинного процесу та гістологічного типу не виявлено (рис.5.6.).

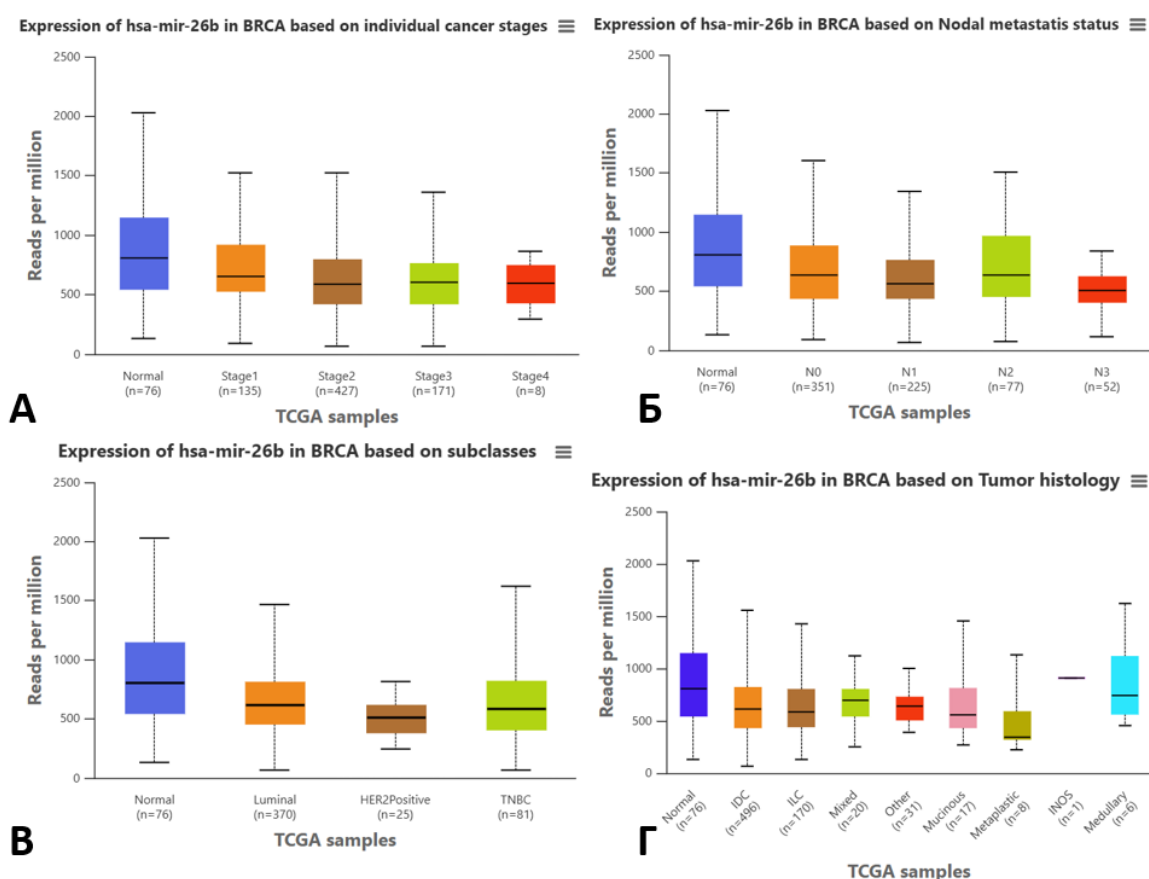


Рис.5.6. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26b-5p зі стадією пухлинного процесу (А), статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (Б), молекулярним підтипом (В) та гістологічним типом (Г) у тканині хворих на РМЗ

Показано, що зразки тканини новоутворень HER2/неу-позитивного підтипу мали нижчі рівні мікроРНК-100-5р на 21,17% ($p<0,05$) та 18,90% ($p<0,05$) в порівнянні із тканиною люмінальних, а також потрійно-негативних молекулярних підтипів відповідно. Крім того, статистично вищі на 39,63% ($p<0,05$) рівні мікроРНК зафіксовано у тканині долькової аденокарциноми порівняно із протоковим РМЗ. Залежності експресії мікроРНК-100-5р від стадії пухлинного процесу та статусу ураження регіонарних лімфатичних вузлів (рис.5.7.).

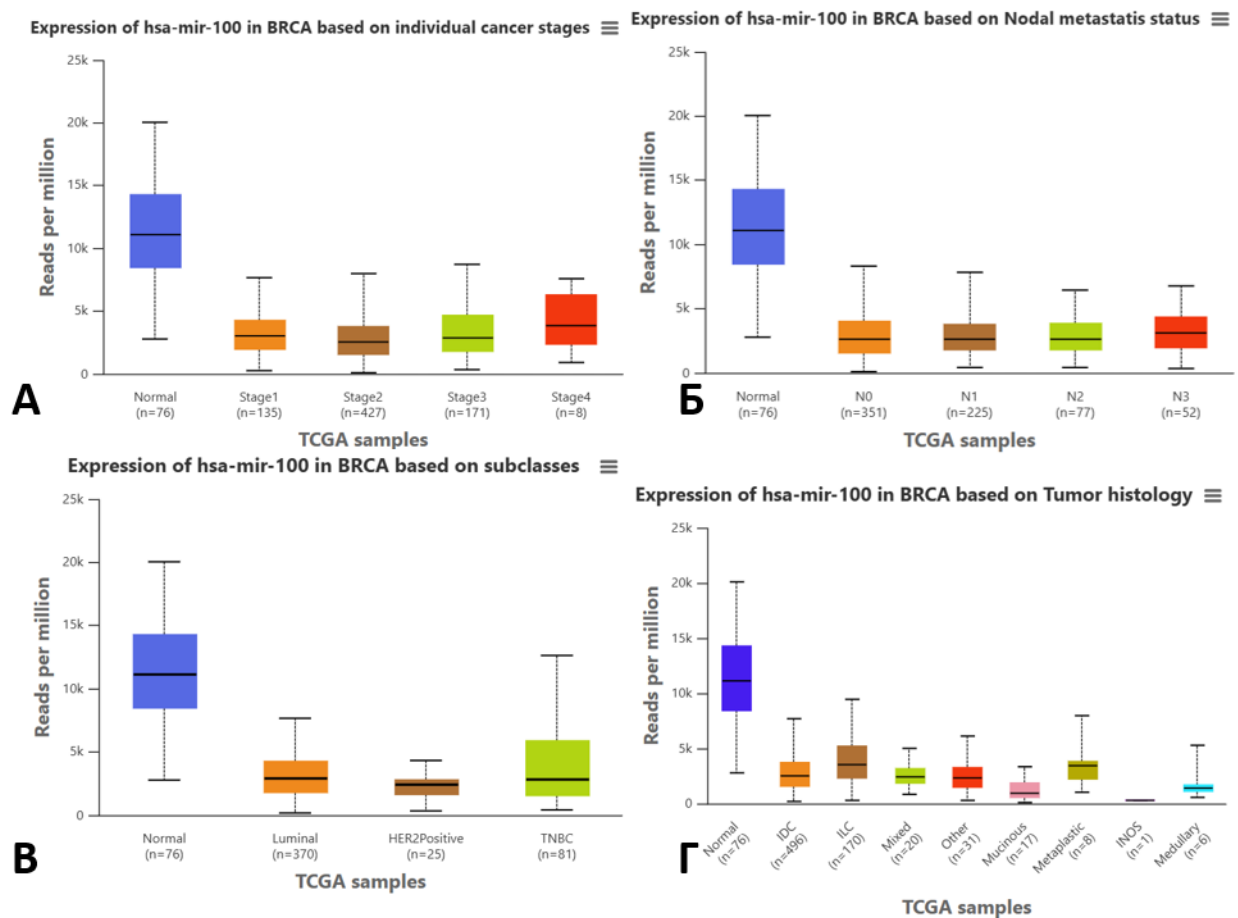


Рис.5.7. Зв'язок показників експресії мікроРНК-100-5р зі стадією пухлинного процесу (А), статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (Б), молекулярним підтипом (В) та гістологічним типом (Г) у тканині хворих на РМЗ

Виявлено, що тканина РМЗ 3-ї стадії характеризується статистично нижчими на 33,86% ($p < 0,05$) та 21,16% ($p < 0,05$) рівнями мікроРНК-142-3р порівняно із зразками пухлин 1-ї стадії відповідно. Статистично найнижчі на 65,74% ($p < 0,05$), 68,20% ($p < 0,05$) та 91,76% ($p < 0,05$) рівні експресії цієї мікроРНК зафіксовані в тканині РМЗ хворих категорії N3 порівняно із зразками тканини категорії N0, N1 та N2 відповідно.

Показано, що зразки тканини новоутворень потрійно негативного підтипу мали нижчі рівні мікроРНК-100-5р у 2,39 ($p < 0,05$) та 1,08 ($p < 0,05$) разів у порівнянні із тканиною люмінальних, а також HER2/neu-позитивних молекулярних підтипів відповідно. Крім того, статистично нижчі в 2,62 раза ($p < 0,05$) рівні цієї мікроРНК зафіксовано у тканині долькової аденокарциноми порівняно із протоковим РМЗ (рис.5.8.).

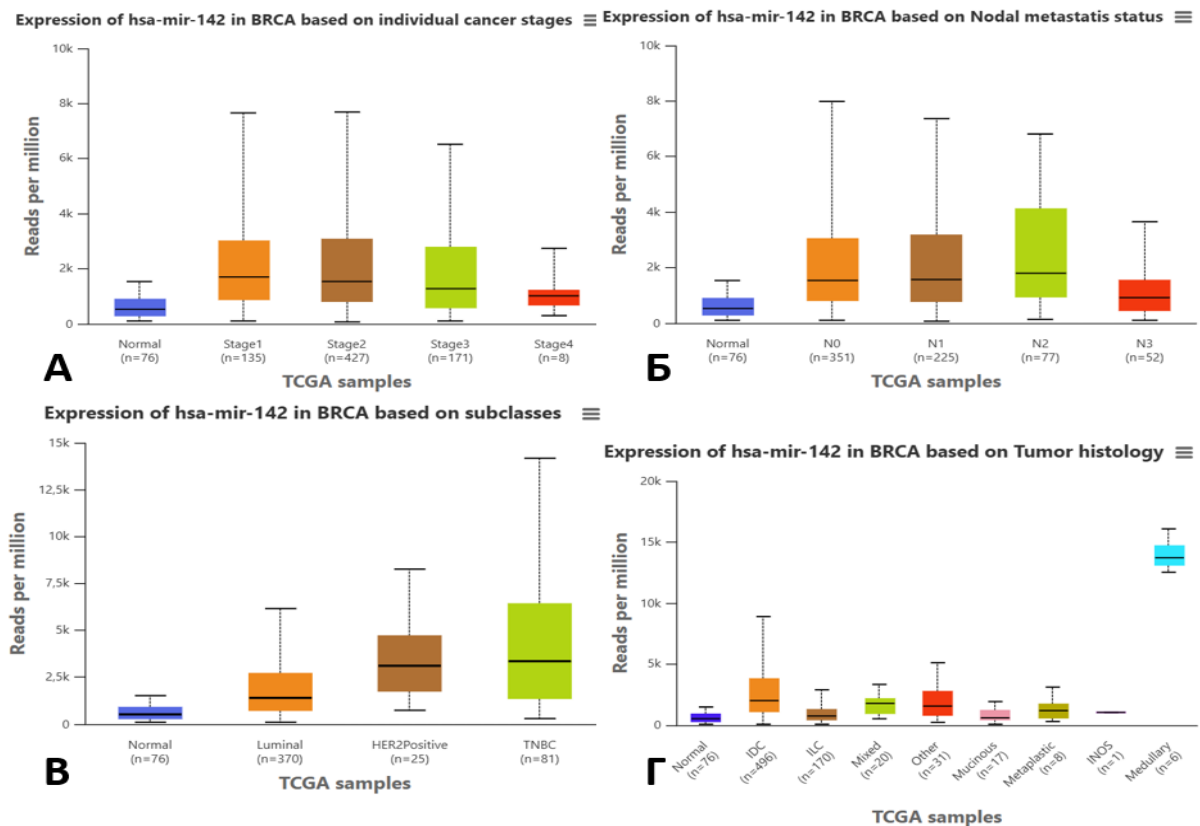


Рис.5.8. Зв'язок показників експресії мікроРНК-142-3р зі стадією пухлинного процесу (А), статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (Б), молекулярним підтипом (В) та гістологічним типом (Г) у тканині хворих на РМЗ

В ході біоінформатичного аналізу показано, що характерною ознакою РМЗ люмінальних молекулярних підтипів протокового типу є достовірно нижчі показники експресії мікроРНК-143-3р порівняно із зразками новоутворень потрійно негативного та долькового РМЗ на 22,6% ($p < 0,05$) та 44,23% ($p < 0,05$) відповідно (рис.5.9.).

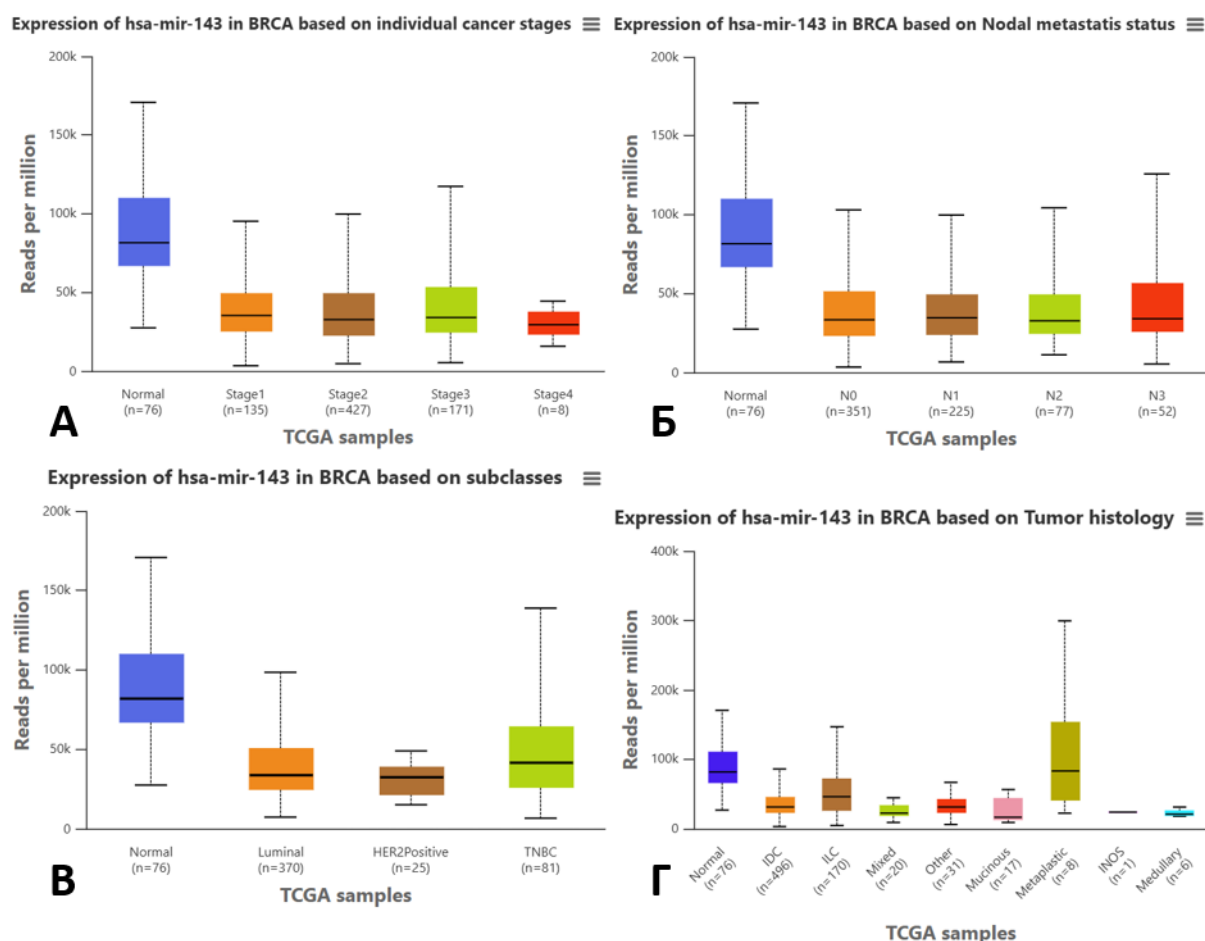


Рис.5.9. Зв'язок показників експресії мікроРНК-143-3р зі стадією пухлинного процесу (А), статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (Б), молекулярним підтипом (В) та гістологічним типом (Г) у тканині хворих на РМЗ

Таким чином, в ході проведеного нами дослідження в системі *in silico*, для подальшої ідентифікації прогностичного та предиктивного значення при

PM3 було відібрано мікроРНК-26b-5p, мікроРНК-100-5p, мікроРНК-142-3p та мікроРНК-143-3p.

5.2. Оцінка клінічного значення експресії ідентифікованих мікроРНК у хворих на рак молочної залози в системі *ex vivo*

Дослідження в системі *ex vivo* встановило, що підвищення експресії пухлино-асоційованої мікроРНК-100-5p пов'язане із початковою стадією пухлинного процесу та меншим розміром новоутворень (рис.5.10.). Водночас маніфестація пухлинного процесу до регіонарних лімфатичних вузлів пов'язана із зниженням експресії мікроРНК-26b-5p у 2,17 раза ($p < 0,05$).

В ході дослідження показано, що характерною особливістю люмінального В-молекулярного підтипу є статистично значуще підвищення експресії мікроРНК-26b-5p ($p < 0,05$), тоді як для тканини PM3 HER2/neu-позитивного підтипу зафіксовано достовірне зростання експресії мікроРНК-142-5p ($p < 0,05$) (рис.5.11.).

Доведено, що підвищення експресії мікроРНК-142-3p у 3,76 ($p < 0,05$) та 4,17 ($p < 0,05$) разів у пухлинній тканині пов'язане із негативним статусом експресії ER та PR, порівняно із зразками рецептор-позитивного PM3. Крім того, висока проліферативна активність ($Ki-67 > 14\%$) асоціюється із зниженими рівнями експресії мікроРНК-26b-5p у 3,95 разів ($p < 0,05$) (рис.5.12.).

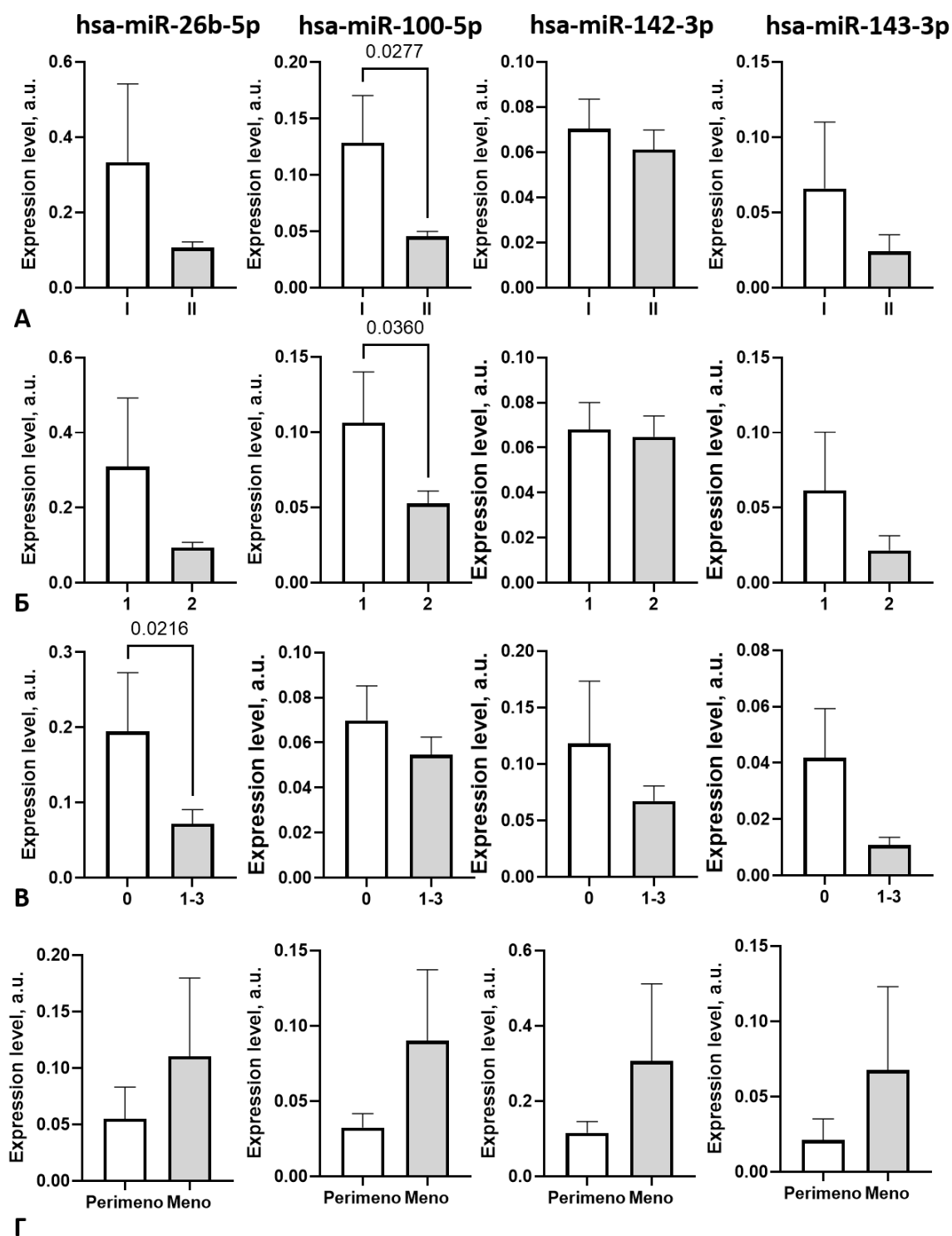


Рис.5.10. Зв'язок експресії досліджуваних мікроРНК зі стадією пухлинного процесу (А), розміром новоутворень (Б), статусом ураження регіонарних лімфатичних вузлів (В), а також репродуктивним статусом (Г) хворих на РМЗ

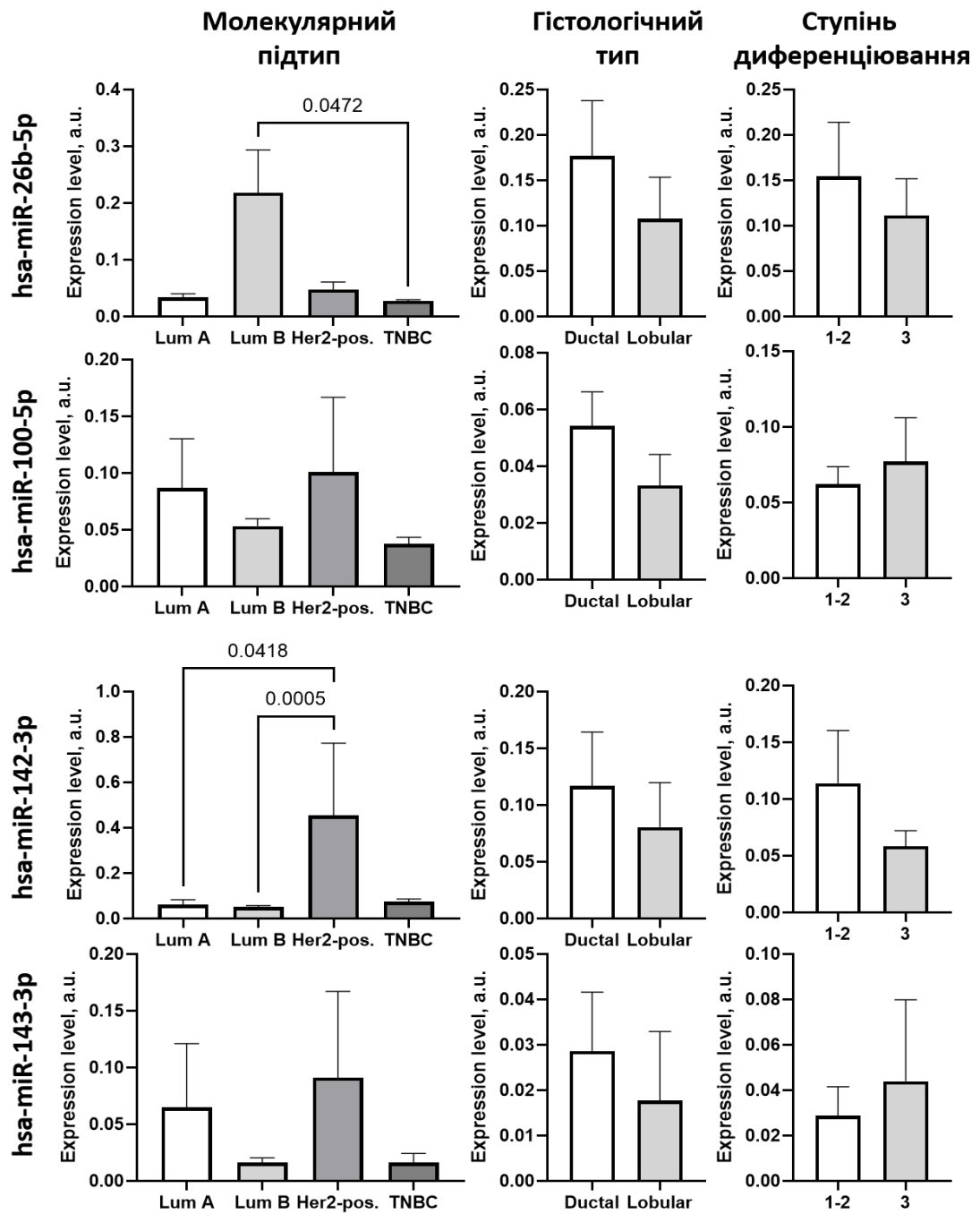


Рис. 5.11. Зв'язок експресії досліджуваних мікроРНК з молекулярним підтипом, гістологічним типом та ступенем диференціювання новоутворень молочної залози

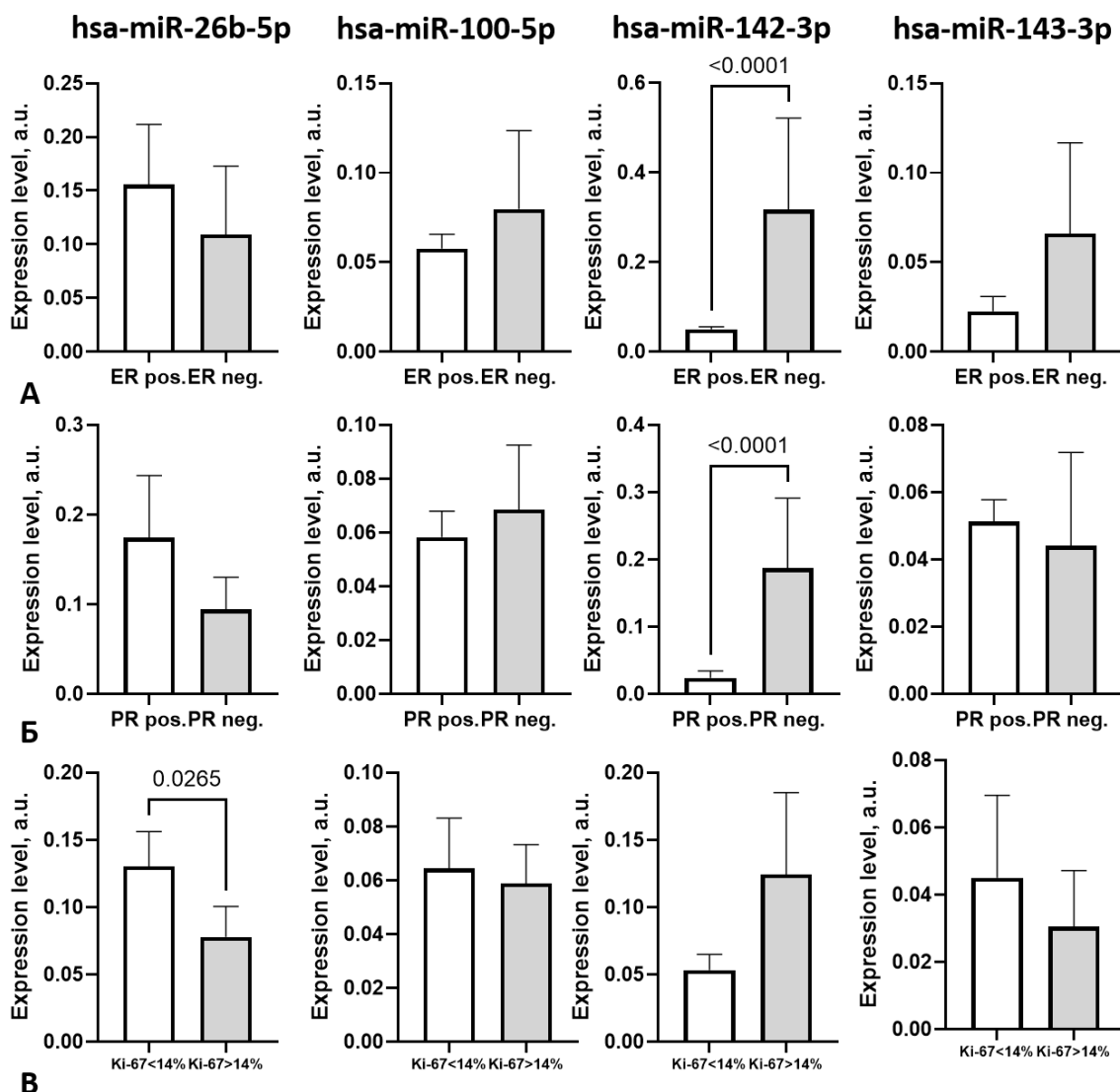


Рис.5.12. Зв'язок рівнів досліджуваних мікроРНК зі статусом експресії ER(A), PR (Б), а також з рівнями експресії Ki-67 у пухлинній тканині хворих на РМЗ

Таким чином, отримані результати дозволяють із впевненістю стверджувати про високий прогностичний потенціал мікроРНК-26b-5p, мікроРНК-100-5p та мікроРНК-142-3p при РМЗ.

Результати проведених досліджень в розділі 3 опубліковано у [131, 133].

РОЗДІЛ 6. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

РМЗ є біологічно неоднорідним захворюванням, перебіг якого визначається не лише властивостями злоякісно трансформованих клітин, а й станом пухлинного мікрооточення. Строма новоутворення, до складу якої входять клітинні елементи, судини та позаклітинний матрикс, бере активну участь у регуляції проліферації, інвазії, метастазування та відповіді на лікування [15–22]. Центральним структурним компонентом ПКМ є колагеновий каркас. Його біологічне значення визначається не тільки кількістю колагену, а й типоспецифічним складом, ступенем зшивання, механічними властивостями та просторовою організацією волокон [18–20, 26, 29, 40, 44–46]. Тому аналіз пухлинної стромы потребує переходу від її загальної описової характеристики до кількісної оцінки конкретних морфометричних ознак.

Наявні дані свідчать, що зміни форми, довжини, ширини, щільності та орієнтації колагенових волокон пов'язані з інвазивністю і прогнозом РМЗ [87, 98–107]. Водночас напрямки і вираженість окремих змін залежать від гістологічного контексту, методики візуалізації та способу сегментації волокон. Недостатньо з'ясованим залишається також зв'язок кінцевого морфологічного фенотипу колагенової матриці з експресією структурних генів, білків протеолітичного ремоделювання, ферментів крослінкінгу та регуляторних мікроРНК. Саме тому в цій роботі морфометричні характеристики колагену були зіставлені з клініко-патологічними ознаками РМЗ, експресією COL1A1, COL3A1, MMP1, MMP8, TIMP3, LOX та профілем досліджених мікроРНК. Такий підхід дав змогу розглядати колагенову строму не як ізольовану гістологічну ознаку, а як інтегральний фенотип взаємодії синтетичних, протеолітичних і регуляторних механізмів.

6.1. Методичні засади кількісного аналізу колагенової стромі РМЗ

Патоморфологічне дослідження залишається базовим методом об'єктивної оцінки тканинної організації РМЗ [109]. Для візуалізації фібрилярного колагену можуть застосовуватися трихромні гістохімічні забарвлення, пікросиріус червоний у поєднанні з поляризаційною мікроскопією та генерація другої гармоніки [108, 110–113]. Методи генерації другої гармоніки дають змогу безпосередньо візуалізувати фібрилярний колаген і досліджувати його ультраструктуру, однак потребують спеціалізованого обладнання та складної стандартизації. Натомість світлова мікроскопія гістохімічно забарвлених препаратів є доступнішою для рутинних патоморфологічних лабораторій, що визначило вибір методичного підходу для дисертаційного дослідження.

Для кількісного опису колагенового каркасу нами розроблено послідовність аналізу цифрових мікрофотографій гістологічних препаратів РМЗ. Візуалізацію колагену здійснювали за допомогою забарвлення за Маллорі, яке забезпечувало достатній контраст між волокнистим компонентом стромі та пухлинною паренхімою. Після стандартизованої попередньої обробки зображень у Adobe Photoshop CC 2019 отримували монохромні зображення, придатні для визначення площі стромального і паренхіматозного компонентів у ImageJ. Для виділення окремих волокон та розрахунку їх просторових характеристик використовували CurveAlign v. 4.0 beta з модулями СТ та СТ-FIRE. Застосування таких програмних засобів відповідає сучасному напрямку цифрової морфометрії, у межах якого довжину, ширину, прямолінійність, кут орієнтації та щільність волокон визначають після комп'ютерної сегментації зображення [97, 108, 114].

Принциповою перевагою запропонованого підходу є можливість отримання відтворюваних кількісних показників зі світлопольних

гістологічних зображень без використання дорогої нелінійно-оптичної системи. Раніше авторським колективом було показано діагностичну перспективність алгоритму, заснованого на параметрах організації колагену, для розмежування пухлин молочної залози [99]. У межах цієї роботи сферу застосування підходу розширено: морфометричні ознаки зіставлено не лише з фактом наявності злоякісного новоутворення, а й із категоріями T і N, ступенем диференціювання, молекулярним підтипом та молекулярними характеристиками ремоделювання строми РМЗ.

Водночас кількісний аналіз цифрових мікрофотографій залежить від стандартизації преаналітичного й аналітичного етапів. Товщина зрізу, інтенсивність забарвлення, освітлення, збільшення, вибір поля зору, порогові значення сегментації та якість відокремлення суміжних волокон можуть впливати на кінцеві результати. З огляду на це морфометричні параметри доцільно інтерпретувати як складову комплексного патоморфологічного дослідження, а не як заміну верифікації гістологічного типу, ступеня диференціювання чи рецепторного статусу. Саме стандартизація отримання зображень і контроль якості сегментації є необхідними передумовами подальшого включення таких показників до автоматизованих систем аналізу [104–106, 114–119].

6.2. Просторова реорганізація колагенового матриксу як ознака прогресування РМЗ

Отримані результати підтвердили, що прогресування РМЗ супроводжується не односпрямованим накопиченням або втратою колагену, а якісною перебудовою його просторової архітекtonіки. У пухлинах із більш вираженими ознаками злоякісності спостерігали зростання щільності колагенових волокон одночасно зі зменшенням їх ширини та довжини. Така комбінація структурних особливостей свідчить про формування щільніше

упакованої мережі з більшою кількістю коротких і тонких структур, що може відображати інтенсивний синтез нового матриксу на тлі його активного протеолітичного ремоделювання. Отже, показник щільності не слід ототожнювати із загальним вмістом колагену: він характеризує передусім просторове розташування сегментованих волокон у досліджуваній площі.

Найбільш виражені зміни ширини та довжини колагенових волокон були пов'язані зі ступенем поширеності РМЗ. За наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів ширина волокон у тканині первинної пухлини зменшувалася на 19,3%, а довжина — на 20,0%. У пухлинах хворих із віддаленими метастазами зменшення довжини досягало 60,3%, а ширини — 48,0%. Ці результати узгоджуються з виявленими кореляціями: категорія Т обернено корелювала із шириною ($r=-0,751$; $p<0,0001$) та довжиною волокон ($r=-0,657$; $p<0,0001$) і прямо — з їх щільністю ($r=0,491$; $p=0,00235$). Категорія N мала обернений зв'язок із шириною ($r=-0,711$; $p<0,0001$) і прямі зв'язки зі щільністю колагенової матриці ($r=0,790$; $p<0,0001$) та TSR ($r=0,688$; $p<0,0001$). Зниження ступеня диференціювання також супроводжувалося зменшенням ширини ($r=-0,638$; $p<0,0001$) та збільшенням щільності волокон ($r=0,565$; $p=0,000329$).

Виявлений профіль фенотипових проявів узгоджується з уявленням про колагенову строму як динамічний субстрат інвазії. У перитуморальній зоні РМЗ описано випрямлення, вирівнювання та переорієнтацію волокон, які формують напрямлені траєкторії руху пухлинних клітин [87, 100, 101]. Експериментальні дослідження також показують, що структура колагенової мережі та довжина доступних фібрилярних шляхів впливають на характер і швидкість міграції злоякісних клітин [127]. У нашому дослідженні міжгруповий аналіз виявив зростання прямолінійності волокон у пухлинах із метастатичним ураженням лімфатичних вузлів. Водночас у кореляційній матриці на рівні індивідуальних випадків прямолінійність не мала статистично значущого зв'язку з категорією N. Це свідчить, що її зміни можуть залежати від поєднання декількох молекулярних і тканинних

факторів та не зводяться до лінійної залежності від одного клінічного показника.

Подібна контекстна залежність стосується TSR, який відображає кількісне співвідношення пухлинної паренхіми та строми, однак не характеризує склад, функціональну активність і просторову організацію стромального компонента. У літературі низький TSR, тобто відносно велика частка строми, пов'язували з несприятливою безрецидивною виживаністю хворих на РМЗ [41]. У нашій вибірці TSR прямо корелював із категорією N, тоді як його зв'язок із молекулярним підтипом мав лише характер статистичної тенденції ($r=0,576$; $p=0,076934$). Тому одержані дані не дають підстав розглядати TSR як самостійний маркер певного молекулярного підтипу, але підтверджують доцільність його використання разом із характеристиками окремих волокон.

Порівняння з опублікованими даними підтверджує клінічну значущість саме комплексної характеристики колагену. При РМЗ описано зміну форми та просторової впорядкованості волокон [98], зв'язок архітектури колагену з мамографічною щільністю і ступенем ураження [101], а також асоціації довжини, щільності та інших характеристик колагенового каркасу з виживаністю хворих [102, 106]. Комп'ютеризований аналіз пухлино-асоційованих колагенових сигнатур давав змогу ідентифікувати групи пацієнток високого ризику [104, 105]. Результати нашої роботи доповнюють ці дані, оскільки демонструють узгоджений зв'язок ширини та щільності волокон одразу з трьома базовими ознаками прогресування РМЗ — категоріями T, N і ступенем диференціювання.

Таблиця 6.1.

Кореляційна матриця клініко-патологічних характеристик РМЗ та кількісних показників просторової організації колагенової матриці.

Статистично значуща різниця ($p < 0,05$) виділена курсивом

	Розмір пухлини (категорія T)	Метастази в лімфатични х вузлах (категорія N)	Ступінь диференцію вання (G)	Молекуляр ний підтип
Ширина	-0,75101	-0,71141	-0,63849	0,127689
Довжина	-0,65654	-0,15082	-0,05931	-0,20831
Прямолінійність	0,2512	0,074914	0,069267	-0,14205
Кут	-0,18851	-0,1135	-0,02134	0,298565
Щільність	0,491185	0,790265	0,565149	-0,06608
TSR	-0,30372	0,688217	0,226493	0,575725

Водночас напрямок окремих асоціацій не є універсальним для всіх пухлин і клінічних ситуацій. Наприклад, при протоковій карциномі *in situ* нижчий ризик рецидиву був пов'язаний із ширшими, менш прямими та щільніше розташованими волокнами [107], а в пухлинах іншого гістогенезу збільшення довжини колагенових волокон могло мати несприятливе прогностичне значення [103]. Це підкреслює, що морфометричні параметри мають оцінюватися в межах конкретного гістологічного й клінічного контексту. Для інвазивного РМЗ у дослідженій вибірці найбільш

послідовним фенотипом агресивності виявилося поєднання тонших і коротших волокон із підвищеною щільністю колагенової мережі.

6.3. Молекулярна регуляція архітекtonіки колагену за участі білків ремоделювання пухлинної строми

Формування колагенової архітекtonіки є наслідком балансу синтезу структурних білків, їх протеолітичної деградації, інгібування протеаз і ферментативного зшивання. У цій роботі проаналізовано експресію MMP1 і MMP8 як колагеназ, TIMP3 як матрикс-зв'язаного інгібітора металопротеїназ і LOX як ферменту ковалентного зшивання колагену. Сукупність отриманих клініко-патологічних асоціацій дала змогу визначити білковий профіль, характерний для пухлин з ознаками агресивності.

Низькодиференційовані пухлини характеризувалися підвищенням експресії MMP1 на 59,2%, MMP8 — на 96,6% та LOX — у 2,05 рази. Експресія LOX прямо залежала від поширеності пухлинного процесу: у пухлинах категорії T2 її рівень був вищим на 74,2%, а за наявності ураження регіонарних лімфатичних вузлів — на 57,8%. Водночас збільшення розміру новоутворення супроводжувалося зниженням експресії TIMP3 на 65,6%. Отже, прогресування РМЗ було пов'язане з переважанням протеолітичних і крослінкінгових механізмів на тлі послаблення матрикс-зв'язаного інгібування MMP.

Окремі асоціації відображали біологічну неоднорідність РМЗ. Максимальний рівень MMP1 визначено у пухлинах II стадії; його експресія була на 42,3% вищою у часточковій карциномі порівняно з протоковою та переважала у люмінальних А і В підтипах. Експресія MMP8 зростала на 42,1% у пацієток у менопаузі. Рівень TIMP3, навпаки, знижувався після настання менопаузи на 41,5%, але був на 78,0% вищим в ER-позитивних новоутвореннях. Ці результати свідчать, що експресію білків ремоделювання

не можна трактувати виключно як лінійну функцію стадії: вона залежить також від гістологічного типу, рецепторного профілю, ступеня диференціювання та системного гормонального контексту.

Виявлений профіль узгоджується з функціональними властивостями досліджених білків. MMP1 ініціює розщеплення фібрилярних колагенів I і III типів, а її підвищена експресія у пухлиноасоційованих фібробластах PM3 пов'язана з прогресуванням і несприятливим прогнозом [47–51, 59]. MMP8 також здатна деградувати фібрилярні колагени, однак її роль у пухлинному процесі є контекст-залежною: поряд із ремоделювальною активністю для неї описано антиметастатичні ефекти, пов'язані із сигнальною віссю декорин—miR-21 [52, 60, 61]. TIMP3 локалізується в ПКМ та обмежує активність металопротеїназ, тому зниження його експресії у пухлинах більшого розміру може створювати умови для менш контрольованого протеолізу [47, 48]. LOX, навпаки, стабілізує колагенові волокна шляхом утворення ковалентних зшивок, підвищує механічну жорсткість матриксу та бере участь у формуванні інвазивного й метастатичного фенотипу [19, 69–75].

Клінічні асоціації білків були доповнені прямим зіставленням їх експресії з морфометричними характеристиками колагену. MMP1 позитивно корелювала з прямолінійністю волокон ($r=0,273$; $p=0,044$). Цей зв'язок не означає, що MMP1 безпосередньо випрямляє колагенові структури, але вказує, що посилення колагенолізу супроводжується перебудовою мережі у бік більш лінійної організації. У такій ситуації вибіркова деградація частини волокон може відбуватися одночасно з натягненням і переорієнтацією збережених структур фібробластами та пухлинними клітинами.

Таблиця 6.2.

**Кореляційні зв'язки між показниками експресії білків
ремоделювання колагенової стромы та морфометричними параметрами
фібрилярної матриці новоутворень РМЗ**

		COL1 A1	COL3 A1	MMP- 1	MMP- 8	TIMP 3	LOX	miR- 26b- 5p	miR- 100- 5p	miR- 143- 3p	miR- 142- 3p
Width	R	0,116	0,308	0,045	-0,303	-0,314	0,025	-0,178	0,024	0,474	-0,086
	p	0,464	0,049	0,741	0,023	0,048	0,871	0,542	0,939	0,03	0,748
Length	R	0,16	0,191	-0,099	-0,267	-0,242	0,055	-0,081	-0,002	0,442	0,232
	p	0,317	0,232	0,469	0,046	0,132	0,722	0,784	1,000	0,044	0,385
Straightness	R	-0,101	0,330	0,273	-0,264	-0,391	0,119	0,596	0,549	0,488	0,19
	p	0,53	0,035	0,044	0,048	0,012	0,438	0,026	0,045	0,024	0,477
Angle	R	0,069	-0,083	-0,037	-0,199	0,443	0,301	-0,063	0,164	0,085	-0,1
	p	0,669	0,608	0,784	0,144	0,005	0,046	0,831	0,573	0,713	0,713
TSR	R	-0,285	-0,051	-0,195	0,1	-0,163	0,221	0,066	0,133	-0,009	0,594
	p	0,211	0,827	0,31	0,597	0,48	0,335	0,865	0,743	0,989	0,045
Density	R	-0,393	-0,394	-0,123	0,223	-0,462	0,059	-0,622	-0,263	-0,533	-0,138
	p	0,042	0,046	0,473	0,182	0,023	0,767	0,035	0,434	0,062	0,637

Для MMP8 виявлено обернені кореляції із шириною ($r=-0,303$; $p=0,023$), довжиною ($r=-0,267$; $p=0,046$) та прямолінійністю волокон ($r=-0,264$; $p=0,048$). Поєднання цих асоціацій із майже дворазовим зростанням MMP8 у G3-пухлинах свідчить, що висока експресія ферменту пов'язана з формуванням тонших, коротших і менш прямих колагенових структур. Цей результат найбільш безпосередньо поєднує клінічну ознаку агресивності з молекулярним механізмом деградації та кінцевим морфологічним фенотипом матриксу.

TIMP3 продемонстрував найбільшу кількість зв'язків серед досліджених білків: його експресія обернено корелювала із шириною ($r=-0,314$; $p=0,048$), прямолінійністю ($r=-0,391$; $p=0,012$) та щільністю волокон ($r=-0,462$; $p=0,023$), але прямо — з кутом їх орієнтації ($r=0,443$; $p=0,005$). На перший погляд, негативні кореляції інгібітора MMP із частиною морфометричних параметрів можуть здаватися суперечливими. Однак рівень експресії TIMP3 відображає лише одну ланку регуляції й не є прямим

показником сумарної протеолітичної активності. Одержані дані можуть відображати компенсаторну відповідь тканини на активне ремоделювання або залежність TIMP3 від клітинного складу стромы. Водночас його прямий зв'язок із кутом орієнтації вказує, що обмеження протеолізу може бути пов'язане зі стабілізацією певного просторового розташування волокон.

Експресія LOX прямо корелювала з кутом орієнтації колагенових волокон ($r=0,301$; $p=0,046$). З огляду на функцію LOX у формуванні міжмолекулярних зшивок, цей зв'язок може відображати стабілізацію переорієнтованих волокон у процесі росту пухлини. Важливо, що LOX не корелювала з шириною, довжиною або щільністю. Отже, її внесок у дослідженій вибірці більшою мірою стосувався просторової фіксації та орієнтації волокон, ніж їх розмірних характеристик. Сукупність підвищення LOX у T2-, N1–3- і G3-пухлинах та її зв'язку з кутом орієнтації формує послідовний ланцюг «клінічна агресивність — крослінкінг матриксу — просторова реорганізація колагену».

6.4. Зв'язок експресії COL1A1, COL3A1 і мікроРНК з морфометричним фенотипом стромы PM3

Експресія генів структурних колагенів відображає синтетичну ланку ремоделювання ПКМ, однак рівень мРНК не є тотожним кількості сформованих волокон. На кінцевий морфологічний фенотип впливають трансляція, секреція проколагену, фібрилогенез, ковалентне зшивання та протеоліз. Колаген I типу забезпечує механічну міцність матриксу, тоді як колаген III типу коасемблюється з ним і регулює діаметр та механічну податливість гетеротипових фібрил [85, 89–92]. Тому морфометричні кореляції COL1A1 і COL3A1 характеризують не просту залежність «більше транскрипту — більше колагену», а результат багаторівневої перебудови.

COL1A1 не мав статистично значущих зв'язків із шириною, довжиною, прямолінійністю, кутом орієнтації чи TSR, проте обернено корелював зі

щільністю волокон ($r=-0,393$; $p=0,042$). Для COL3A1 встановлено прямі кореляції із шириною ($r=0,308$; $p=0,049$) та прямолінійністю ($r=0,330$; $p=0,035$) і обернену — зі щільністю ($r=-0,394$; $p=0,046$). Отже, підвищена експресія COL3A1 була пов'язана з формуванням ширших і більш прямих, але менш щільно розташованих структур. Негативний зв'язок щільності з обома структурними генами додатково підтверджує, що морфометрична щільність не відображає безпосередньо інтенсивність синтезу колагену, а характеризує спосіб просторової упаковки сегментованих волокон.

Окрему ланку регуляції становлять мікроРНК, здатні координувати експресію багатьох генів, залучених до синтезу, деградації та клітинної організації ПКМ [120, 121]. Їх вплив може реалізовуватися як у пухлинних клітинах, так і у фібробластах, імунних та інших клітинах мікрооточення. Міжклітинне перенесення мікроРНК у складі позаклітинних везикул створює додатковий механізм реципрокної взаємодії між пухлинною паренхімою і стромою [37–39, 124, 125]. У РМЗ профілі мікроРНК також залежать від клінічних характеристик і віку хворих [126], що обґрунтовує їх одночасне зіставлення з морфометричними та клініко-патологічними показниками.

У межах нашого дослідження підвищена експресія miR-26b-5p асоціювалася з відсутністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (N0) і люмінальним В-підтипом РМЗ. Збільшення рівня miR-100-5p було пов'язано із меншим розміром пухлини та початковою стадією пухлинного процесу, тоді як зростання експресії miR-142-3p було характерним для HER2/неу-позитивних новоутворень. Отже, ці мікроРНК відображали різні аспекти біологічної неоднорідності РМЗ: локальну поширеність, лімфогенне метастазування та молекулярний підтип.

Найсильніші морфометричні кореляції серед досліджених мікроРНК виявлено для miR-26b-5p. Її експресія прямо корелювала з прямолінійністю ($r=0,596$; $p=0,026$) та обернено — зі щільністю колагенових волокон ($r=-0,622$; $p=0,035$). У поєднанні з асоціацією miR-26b-5p зі статусом N0 це свідчить, що підвищення її рівня пов'язане з морфометричним фенотипом

більш прямих, але менш щільно упакованих волокон і відсутністю лімфогенної дисемінації. Водночас кореляційний дизайн дослідження не дає змоги визначити, чи є miR-26b-5p безпосереднім регулятором такої архітекtonіки, чи відображає активність інших клітинних і молекулярних процесів.

Експресія miR-100-5p прямо корелювала з прямолінійністю волокон ($r=0,549$; $p=0,045$). Її одночасний зв'язок із меншим розміром пухлини та нижчою стадією вказує на можливість існування узгодженого молекулярно-морфологічного фенотипу менш поширеного пухлинного процесу. Однак відсутність статистично значущих кореляцій miR-100-5p з іншими параметрами колагену не дозволяє розглядати її як універсальний регулятор стромальної організації.

Для miR-143-3p встановлено прямі кореляції із шириною ($r=0,474$; $p=0,030$), довжиною ($r=0,442$; $p=0,044$) і прямолінійністю волокон ($r=0,488$; $p=0,024$). Таке поєднання асоціацій свідчить про зв'язок її експресії з формуванням більш масивних, протяжних і вирівняних колагенових структур. Обернена кореляція зі щільністю не досягла статистичної значущості ($r=-0,533$; $p=0,062$), тому може розглядатися лише як тенденція, що потребує перевірки на більшій вибірці. miR-142-3p не була пов'язана з геометричними характеристиками окремих волокон, але прямо корелювала з TSR ($r=0,594$; $p=0,045$). Це може відображати залежність її експресії від загального співвідношення паренхіматозного та стромального компонентів, однак для встановлення клітинного джерела цієї асоціації необхідні окремі дослідження.

У цілому кореляційна матриця демонструє, що різні морфометричні показники відображають різні ланки ремоделювання. Ширина та довжина найбільшою мірою були пов'язані з COL3A1, MMP8 і miR-143-3p; прямолінійність — одночасно із синтетичними, протеолітичними та мікроРНК-залежними показниками; кут орієнтації — з TIMP3 і LOX; щільність — із COL1A1, COL3A1, TIMP3 та miR-26b-5p; TSR — з miR-142-

Зр. Відсутність єдиного маркера, пов'язаного з усіма характеристиками колагену, підтверджує багатфакторний характер формування його архітекtonіки.

6.5. Інтегрована модель молекулярно-морфологічної перебудови колагенової строми РМЗ

Сукупність одержаних результатів є підґрунтям для розгляду ремоделювання колагенової строми РМЗ як послідовність взаємопов'язаних, але не тотожних процесів. Синтетична ланка представлена експресією COL1A1 і COL3A1; протеолітична — MMP1 і MMP8; регуляторно-інгібіторна — TIMP3; крослінкінгова — LOX; посттранскрипційна — дослідженими мікроРНК. Їх інтегрована дія формує кінцеві розмірні та топологічні характеристики волокон, які, зі свого боку, пов'язані з розміром пухлини, станом регіонарних лімфатичних вузлів і ступенем диференціювання.

У пухлинах з ознаками високої злоякісності встановлено узгоджений профіль: підвищення експресії MMP1, MMP8 і LOX, зниження TIMP3, зменшення ширини й довжини волокон та збільшення щільності колагенової мережі. Найчіткіший взаємозв'язок між клінічними даними та морфометричними параметрами виявлено для MMP8: її експресія зростала у пухлинах ступеня злоякісності G3 і водночас обернено корелювала із шириною, довжиною та прямолінійністю колагенових волокон.»Для LOX послідовність проявлялася в підвищенні експресії у T2-, N1–3- та G3-пухлинах і прямій кореляції з кутом орієнтації волокон. Для TIMP3 зниження експресії у пухлинах більшого розміру поєднувалося з численними зв'язками зі структурними характеристиками матриксу.

МікроРНК доповнювали цю систему на регуляторному рівні. miR-26b-5p і miR-100-5p були пов'язані з клінічними ознаками менш поширеного

процесу та з прямолінійністю волокон, miR-143-3p — з їх шириною, довжиною і прямолінійністю, а miR-142-3p — з TSR і HER2-позитивним підтипом. Ці результати не доводять прямого регуляторного впливу окремої мікроРНК на конкретний морфометричний показник, але визначають пріоритетні молекулярно-морфологічні зв'язки для подальшої функціональної перевірки.

Таким чином, виявлені зміни можна об'єднати в концептуальну систему «молекулярна регуляція — синтез, деградація та зшивання колагену — просторова архітектура строми — клініко-патологічний фенотип РМЗ». Суттєвим є те, що елементи цієї системи перебувають у стані постійної двосторонньої взаємодії. З одного боку, експресія структурних генів і ферментів визначає властивості матриксу; з іншого — жорсткість, натягнення та орієнтація колагену через механотрансдукційні сигнали можуть підтримувати активований фенотип фібробластів та інвазивну поведінку пухлинних клітин [19, 29, 44–46, 85, 87]. Саме ця взаємозалежність пояснює, чому для оцінки стану пухлинної строми недостатньо одного молекулярного або морфологічного маркера (рис.6.1.).



Рис.6.1. Узагальнююча схема молекулярних механізмів ремоделювання колагенової строми та їх зв'язку з морфометричними і клініко-патологічними характеристиками РМЗ.

6.6. Прогностичні моделі та перспективи клінічного використання морфометричних параметрів

З огляду на наявність значущих кореляцій між морфометричними параметрами та клініко-патологічними характеристиками, було побудовано множинні регресійні моделі для категорій T і N та ступеня диференціювання. На відміну від парної кореляції, такий аналіз дає змогу оцінити незалежний внесок окремих характеристик колагену за одночасного включення декількох предикторів.

Розроблена модель для категорії T описувала 67,9% дисперсії залежної змінної. ($R^2=0,6794$). Незалежними предикторами були ширина ($\beta=-0,463$; $p=0,001399$), довжина ($\beta=-0,323$; $p=0,014873$) і щільність волокон ($\beta=0,243$; $p=0,032003$). Напрямок коефіцієнтів відповідав результатам кореляційного аналізу: збільшення розміру пухлини було пов'язане зі зменшенням ширини та довжини волокон і зростанням щільності колагенової мережі. Отже, геометричні характеристики окремих волокон і спосіб їх просторової упаковки містять взаємодоповнювальну інформацію про локальну поширеність РМЗ.

Найвищу прогностичну цінність демонструвала модель для категорії N ($R^2=0,7716$). Статистично значущими незалежними предикторами були ширина ($\beta=-0,328$; $p=0,012015$), щільність волокон ($\beta=0,417$; $p=0,002070$) і TSR ($\beta=0,320$; $p=0,005705$). Довжина та прямолінійність після одночасного врахування інших параметрів не мали незалежного внеску. Це свідчить, що лімфогенне поширення найповніше характеризується поєднанням двох рівнів організації строми: мікрогеометрії окремих волокон і загального співвідношення паренхіматозного та стромального компонентів.

Ступінь диференціювання пухлини детермінував 48,7% варіабельності аналізованого параметра ($R^2 = 0,4868$). Значущими предикторами були ширина ($\beta=-0,494$; $p=0,003810$) та щільність волокон ($\beta=0,327$; $p=0,041269$),

тоді як довжина і TSR не мали незалежного прогностичного внеску. Таким чином, саме ширина та щільність виявилися найбільш стабільними характеристиками: обидва параметри були пов'язані з категоріями T і N, ступенем диференціювання та входили до всіх трьох моделей.

Одержані моделі підтверджують, що морфометрія колагену має не лише описове, а й потенційне прогностичне значення. Водночас вони потребують зовнішньої валідації на незалежних вибірках, перевірки відтворюваності між різними лабораторіями та оцінювання стійкості до варіацій забарвлення і сегментації. Доцільним є також подальше застосування моделей, адаптованих до категоріальних та порядкових клінічних результатів, і зіставлення морфометричних ознак із даними виживаності та відповіді на лікування. Тому на цьому етапі розроблені моделі слід розглядати як доказ інформативності відібраних ознак і основу для наступного етапу клінічної валідації, а не як готовий автономний діагностичний тест.

Перспективність такого напрямку підтверджують дані про можливість прогнозування перебігу РМЗ за кількісними колагеновими сигнатурами і параметрами каркасу, визначеними на світлопольних гістологічних зображеннях [104–106]. Інтеграція стандартизованої цифрової морфометрії з клініко-патологічними даними створює передумови для застосування методів машинного навчання та розроблення систем підтримки прийняття клінічних рішень в онкоморфології [117–119]. Принципово важливо, щоб такі системи залишалися інтерпретованими: кожна прогностна оцінка повинна бути пов'язана з конкретними вимірюваними ознаками — шириною, довжиною, щільністю, прямолінійністю волокон і TSR — та проходити контроль лікаря-патолога.

Таблиця 6.3.

Результати множинної лінійної регресії де розмір пухлини (категорія T), статус ураження регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N), та ступінь диференціювання (G) були визначені як залежні змінні

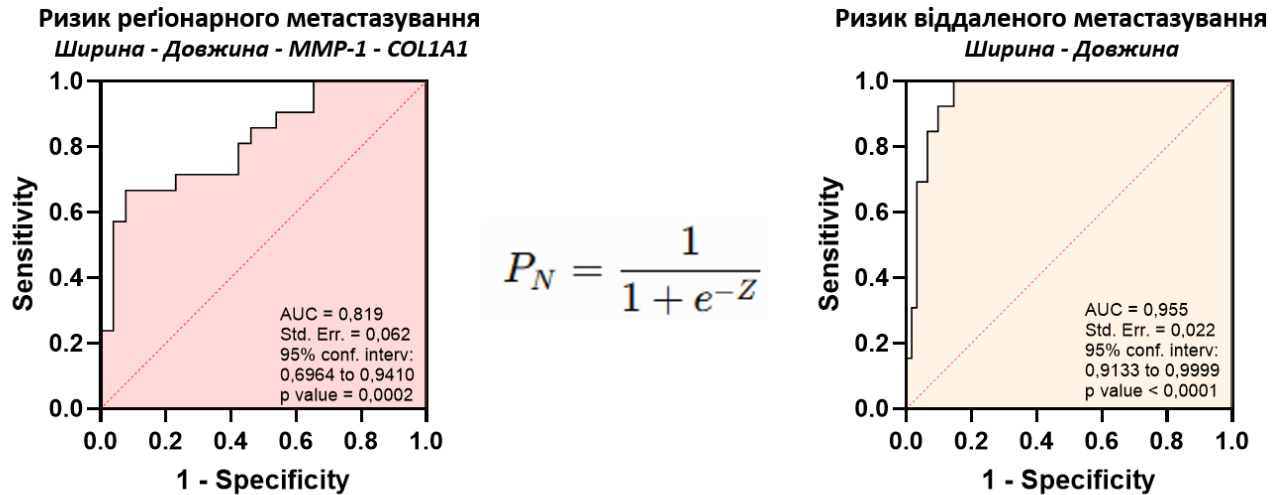
		Tumor size (T)	Lymph node involvement (N)	Differentiation grade (G)
		R2=0.67940939	R2=0.77162898	R2=0.48675879
Ширина	β	-0.46332	-0.32793	-0.49441
	p	0.001399	0.012015	0.003810
Довжина	β	-0.32318	0.112481	0.080845
	p	0.014873	0.250001	0.545608
Прямолінійність	β	-	0.076409	-
	p	-	0.399713	-
Щільність	β	0.242827	0.416609	0.327039
	p	0.032003	0.002070	0.041269
TSR	β	-	0.320168	-0.0395
	p	-	0.005705	0.780628

Для перевірки можливості індивідуалізованої стратифікації хворих за ризиком метастазування у межах додаткової цільової когорти, сформованої з випадків поширеного пухлинного процесу, було побудовано дві бінарні логістичні моделі. Перша модель оцінювала ймовірність регіонарного метастазування за шириною і довжиною колагенових волокон та показниками експресії MMP1 і COL1A1, друга — ймовірність віддаленого метастазування за шириною і довжиною волокон. Обмеження кількості предикторів відповідало пілотному характеру аналізу та зменшувало ризик надмірної параметризації моделей за наявного обсягу вибірки.

Модель оцінювання ризику регіонарного метастазування продемонструвала добру дискримінаційну здатність: площа під ROC-кривою становила $AUC=0,819$ (стандартна похибка — $0,062$; 95% ДІ: $0,6964-0,9410$; $p=0,0002$). Отже, поєднання двох геометричних характеристик колагенових волокон із MMP1 і COL1A1 містило більше інформації про лімфогенне поширення, ніж ізольоване використання окремого показника. Водночас коефіцієнти такої багатофакторної моделі мають інтерпретуватися сукупно, оскільки прогноз формується їх спільним внеском у розраховану ймовірність.

Для моделі віддаленого метастазування достатнім виявилось поєднання ширини та довжини колагенових волокон. Її дискримінаційна здатність була високою ($AUC=0,955$; стандартна похибка — $0,022$; 95% ДІ: $0,9133-0,9999$; $p<0,0001$), а найбільш виражений внесок у рівняння мала довжина волокон. Такий результат узгоджується з виявленим у хворих із віддаленим поширенням вираженим скороченням і стоншенням волокон у первинному пухлинному осередку. Разом із тим високе значення AUC, отримане у спеціально сформованій вибірці з обмеженою кількістю випадків метастазування, може відображати оптимізм моделі, тому не повинно розглядатися як остаточна оцінка її клінічної ефективності без зовнішньої валідації.

Порівняння двох моделей вказує на відмінність інформаційної структури ознак, пов'язаних із різними шляхами дисемінації. Для оцінювання регіонарного метастазування інформативним було поєднання морфометричного та молекулярного рівнів ремоделювання строми, тоді як віддалене поширення у межах дослідженої вибірки з високою точністю описувалося двома базовими характеристиками архітекtonіки колагену. Це дає підстави розглядати ширину і довжину волокон як первинний морфометричний рівень стратифікації, а білкові показники — як додатковий контекст для уточнення ризику лімфогенного поширення.



$$Z = 8,984 - 5,160 \times W - 0,5708 \times L - 0,8478 \times COL1A1 + 0,006136 \times MMP1$$

$$Z = 21,16 + 2,469 \times W - 4,227 \times L$$

Рис. 6.2. ROC-криві пілотних логістичних моделей оцінювання ризику регіонарного (зліва; ширина і довжина колагенових волокон, MMP1 та COL1A1) і віддаленого (справа; ширина та довжина волокон) метастазування РМЗ. Наведено рівняння для розрахунку логіту Z та ймовірності відповідної події

На основі порогових значень, визначених у дослідженій вибірці, сформовано пілотні стромальні профілі ризику. Профіль регіонарного метастазування охоплював ширину волокон $<0,892$ мкм, довжину $<6,939$ мкм, експресію MMP1 $<158,890$ бала за шкалою H-score та відносний рівень COL1A1 $>1,564$ ум. од. Для ризику віддаленого метастазування ключовими були ширина $<0,647$ мкм і довжина $<5,217$ мкм. Додатковий пошуковий аналіз дозволив окреслити органоспецифічні комбінації: для метастазування в легені — ширина $>0,658$ мкм, довжина $>5,090$ мкм і COL1A1 $>1,458$ ум. од., а для ураження печінки — MMP1 $>161,010$ бала за шкалою H-score. Наведені межі є вибіркозалежними класифікаційними орієнтирами і на цьому етапі не можуть використовуватися як універсальні діагностичні нормативи.

Одержані закономірності було формалізовано у вигляді пілотного алгоритму стратифікації хворих на РМЗ за ризиком регіонарного та

віддаленого метастазування (рис. 6.3). Його вихідною точкою є матеріал трепан-біопсії первинної пухлини, що забезпечує можливість оцінювання стромального профілю ще до остаточного визначення обсягу хірургічного втручання.

Алгоритм стратифікації хворих на РМЗ за ризиком регіонарного та віддаленого метастазування



Рис. 6.3. Пілотний алгоритм стратифікації хворих на РМЗ за ризиком регіонарного та віддаленого метастазування на підставі морфометричних характеристик колагенових волокон і показників експресії MMP1 та COL1A1

Запропонована послідовність передбачає стандартне гістологічне опрацювання біопсійного матеріалу та візуалізацію колагену, отримання цифрового зображення, контроль якості сегментації, визначення ширини і довжини волокон, а за потреби — оцінювання MMP1 та COL1A1. Отримані значення вводяться до відповідної логістичної моделі, після чого розрахована ймовірність і стромальний профіль інтерпретуються лікарем-патологом разом із гістологічним типом, ступенем диференціювання, рецепторним статусом та іншими стандартними клініко-патологічними характеристиками. Таким чином, алгоритм не замінює чинну систему діагностики і стадіювання, а доповнює її кількісною оцінкою стану пухлинної строми.

Узагальнення результатів дисертаційної роботи дозволяє охарактеризувати агресивний стромальний фенотип РМЗ як поєднання вкорочення і стоншення колагенових волокон зі зростанням їх прямолінійності, щільності та показника TSR. На молекулярному рівні такому напрямку перебудови відповідає посилення експресії MMP1, MMP8 і LOX та зниження TIMP3, а встановлені асоціації регуляторних мікроРНК із клінічним статусом доповнюють цю модель епігенетичним рівнем контролю. Отже, архітектоніка колагенової строми є результатом координованого балансу синтезу, протеолізу, його інгібування та поперечного зшивання колагену, а її кількісні характеристики відображають біологічну агресивність і здатність пухлини до поширення.

Таким чином, у роботі здійснено перехід від стандартизованого вимірювання окремих компонентів колагенового каркасу до їх інтегрованої прогностичної інтерпретації. Розроблені моделі та пілотний алгоритм визначають можливий формат подальшого клінічного використання морфометрії колагену, однак потребують проспективної перевірки на розширених незалежних вибірках, уніфікації етапів забарвлення і цифрової сегментації та зіставлення з показниками виживаності й відповіді на лікування. Після такої валідації відібрані параметри можуть бути включені до інтерпретованих автоматизованих систем підтримки прийняття клінічних рішень з елементами штучного інтелекту в онкоморфології.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та інноваційне вирішення актуальної проблеми — обґрунтування молекулярно-біологічних та морфометричних критеріїв дезорганізації колагенового каркасу як інформативних чинників агресивності перебігу раку молочної залози. Завдяки розробці та впровадженню автоматизованого алгоритму цифрової сегментації вперше проведено масштабний кількісний аналіз архітекtonіки стромального мікрооточення, що дозволило довести існування специфічного топологічного профілю малігнізації колагенових волокон. Отримані результати відкривають нові перспективи для об'єктивізації онкоморфологічної діагностики РМЗ та розробки систем підтримки прийняття рішень з елементами штучного інтелекту.

1. Розроблено та апробовано алгоритм верифікації параметрів дезорганізації колагенового матриксу у тканині раку молочної залози, який поєднує гістохімічне забарвлення за Маллорі, цифрову сегментацію колагенових волокон та морфометричний аналіз із використанням програм CurveAlign і ImageJ. Апробацію алгоритму проведено на 120 зразках РМЗ та 30 зразках тканини фіброадемом із аналізом близько 1,4 млн колагенових волокон. Доведено, що тканина РМЗ характеризується достовірним зменшенням довжини ($p < 0,001$) і ширини ($p < 0,001$) колагенових волокон на тлі підвищення показників їх прямолінійності ($p < 0,001$) та орієнтації ($p < 0,05$) у порівнянні з тканиною доброякісних новоутворень молочної залози.

2. Встановлено асоціацію топології та кількісних параметрів дезорганізації колагенового матриксу зі ступенем поширеності РМЗ. Збільшення розміру новоутворень корелює зі зменшенням довжини ($p = 0,0006$) і ширини ($p < 0,0001$) колагенових волокон та підвищенням їх щільності ($p = 0,0027$) у тканині РМЗ, а наявність метастазів у регіонарних

лімфатичних вузлах - зі зменшенням довжини ($p < 0,0001$) і ширини ($p < 0,0001$), збільшенням прямолінійності ($p < 0,0001$), щільності ($p < 0,0001$) та показника TSR ($p < 0,0001$). Найбільш тісні корелятивні зв'язки з клінічними характеристиками РМЗ виявлено щодо ширини колагенових волокон (для категорії Т: $r = -0,751$; для категорії N: $r = -0,711$) та їх щільності (для категорії N: $r = 0,790$). Побудовані регресійні моделі показали, що ширина, довжина та щільність колагенових волокон є незалежними предикторами розміру пухлини ($R^2 = 0,679$), а ширина, щільність і показник TSR — незалежними предикторами метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів ($R^2 = 0,772$).

3. Аналіз залежності експресії білків ремоделювання колагенової матриці від клінічного статусу хворих дозволив встановити, що низькодиференційовані пухлини характеризувалися підвищенням експресії MMP1 на 59,2% ($p < 0,05$), MMP8 — на 96,6% ($p < 0,05$) та LOX — у 2,05 рази ($p < 0,05$); збільшення розміру пухлини й ураження регіонарних лімфатичних вузлів супроводжувалися зростанням рівня LOX відповідно на 74,2 і 57,8%, тоді як у пухлинах більшого розміру експресія TIMP3 знижувалася на 65,6%. Отримані результати свідчать, що поєднане визначення MMP1, MMP8, TIMP3 і LOX із морфометричними параметрами колагенових волокон комплексно відображає молекулярні та структурні прояви ремоделювання пухлинної стромы при прогресуванні РМЗ. Крім того, ідентифіковано профіль експресії білків ремоделювання стромального мікрооточення, асоційований з особливостями структурної організації колагенової матриці РМЗ: експресія MMP1 прямо корелювала з прямолінійністю волокон ($r = 0,273$), MMP8 — обернено з їх шириною, довжиною та прямолінійністю (r від $-0,267$ до $-0,303$), TIMP3 — обернено із шириною, прямолінійністю та щільністю волокон і прямо з кутом їх орієнтації (r від $-0,462$ до $0,443$), а LOX — прямо з кутом орієнтації волокон ($r = 0,301$; усі $p < 0,05$).

4. Вперше встановлено асоціацію експресії мікроРНК, залучених до регуляції експресії генів ремоделювання позаклітинного матриксу, з клініко-патологічними характеристиками РМЗ. Показано, що підвищена експресія miR-26b-5p асоціюється з відсутністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (N0) ($p < 0,05$) та люмінальним Б молекулярним підтипом ($p < 0,05$), miR-100-5p – з меншим розміром первинної пухлини ($p < 0,05$) та нижчою стадією пухлинного процесу ($p < 0,05$), а miR-142-3p – з HER2-позитивним молекулярним підтипом ($p < 0,05$). Отримані результати розширюють уявлення про молекулярні механізми ремоделювання пухлинного мікрооточення при раку молочної залози та обґрунтовують доцільність подальшого дослідження зазначених мікроРНК як потенційних молекулярних маркерів перебігу захворювання.

5. За результатами комплексного дослідження процесів ремоделювання колагенової стромі осередку новоутворення сформовано перелік перспективних прогностичних ознак, що охоплює морфометричні параметри просторової організації волокнистого матриксу та показники експресії білків, залучених до його перебудови. Розроблені моделі забезпечують можливість інтегрованого оцінювання морфологічних і молекулярних характеристик пухлинної стромі та прогнозування особливостей перебігу пухлинного процесу. Отримані результати є підґрунтям для створення автоматизованих систем підтримки прийняття клінічних рішень з елементами штучного інтелекту в онкоморфології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021. Vol. 71. P. 209–249. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
2. International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. Lyon : IARC. URL: <https://gco.iarc.fr/today/home> (accessed: 26.07.2026).
3. Fedorenko Z., Soumkina O., Gorokh Ye. et al. Cancer in Ukraine 2020–2021: incidence, mortality, prevalence and other relevant statistics. *Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine.* Kyiv, 2022. No. 23. 89 p.
4. Fedorenko Z., Soumkina O., Gorokh Ye. et al. Cancer in Ukraine 2021–2022: incidence, mortality, prevalence and other relevant statistics. *Bulletin of the National Cancer Registry of Ukraine.* Kyiv, 2023. No. 24. 145 p.
5. Siegel R. L., Miller K. D., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin.* 2017. Vol. 67, no. 1. P. 7–30. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21387>.
6. Bell R. J. Menopausal status at diagnosis of breast cancer and risk of metastatic recurrence. *Menopause.* 2021. Vol. 28, no. 10. P. 1079–1080. DOI: <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001830>.
7. Eden J. A. Menopausal status, adipose tissue, and breast cancer risk: impact of estrogen replacement therapy. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2013. Vol. 14, no. 2. P. 57–63. DOI: <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0007>.
8. De Vos F. Y., van Laarhoven H. W., Laven J. S. et al. Menopausal status and adjuvant hormonal therapy for breast cancer patients: a practical guideline. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012. Vol. 84, no. 2. P. 252–260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.06.005>.
9. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer. SEER Program, 2022. URL: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> (accessed: 26.07.2026).

10. Corey B., Smania M. A., Spotts H. et al. Young Women With Breast Cancer: Treatment, Care, and Nursing Implications. *Clin J Oncol Nurs*. 2020. Vol. 24, no. 2. P. 139–147. DOI: <https://doi.org/10.1188/20.CJON.139-147>.
11. Shoemaker M. L., White M. C., Wu M. et al. Differences in breast cancer incidence among young women aged 20–49 years by stage and tumor characteristics, age, race, and ethnicity, 2004–2013. *Breast Cancer Res Treat*. 2018. Vol. 169, no. 3. P. 595–606. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4699-9>.
12. Gnerlich J. L., Deshpande A. D., Jeffe D. B. et al. Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. *J Am Coll Surg*. 2009. Vol. 208, no. 3. P. 341–347. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2008.12.001>.
13. Murphy B. L., Day C. N., Hoskin T. L. et al. Adolescents and young adults with breast cancer have more aggressive disease and treatment than patients in their forties. *Ann Surg Oncol*. 2019. Vol. 26, no. 12. P. 3920–3930. DOI: <https://doi.org/10.1245/s10434-019-07653-9>.
14. Berg W. A., Blume J. D., Cormack J. B. et al. Combined screening with ultrasound and mammography vs mammography alone in women at elevated risk of breast cancer. *JAMA*. 2008. Vol. 299, no. 18. P. 2151–2163. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.299.18.2151>.
15. Mittal S., Brown N. J., Holen I. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018. Vol. 18, no. 3. P. 227–243. DOI: <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1439382>.
16. Deepak K. G. K., Vempati R., Nagaraju G. P. et al. Tumor microenvironment: Challenges and opportunities in targeting metastasis of triple negative breast cancer. *Pharmacol Res*. 2020. Vol. 153. Art. 104683. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104683>.

17. Anderson N. M., Simon M. C. The tumor microenvironment. *Curr Biol.* 2020. Vol. 30, no. 16. P. R921–R925. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>.
18. Insua-Rodríguez J., Oskarsson T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016. Vol. 97. P. 41–55. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.12.017>.
19. Levental K. R., Yu H., Kass L. et al. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell.* 2009. Vol. 139, no. 5. P. 891–906. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027>.
20. Gurralla R., Byrne C. E., Brown L. M. et al. Quantifying breast cancer-driven fiber alignment and collagen deposition in primary human breast tissue. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021. Vol. 9. Art. 618448. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.618448>.
21. Soysal S. D., Tzankov A., Muenst S. E. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology.* 2015. Vol. 82, no. 3–4. P. 142–152. DOI: <https://doi.org/10.1159/000430499>.
22. Kotsifaki A., Alevizopoulos N., Dimopoulou V. et al. Unveiling the Immune Microenvironment's Role in Breast Cancer: A Glimpse into Promising Frontiers. *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, no. 20. Art. 15332. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms242015332>.
23. Kavetsky R. E. Tumour and host (Kyiv, 1962). *Exp Oncol.* 2012. Vol. 34, no. 2. P. 75–78.
24. Chekhun V. The renaissance of research of the morphofunctional features of the tumor stromal framework in strategies for addressing clinical oncology challenges. *Oncology.* 2025. Vol. 27, no. 1. P. 5–12. DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.01.005>.
25. Neophytou C. M., Panagi M., Stylianopoulos T. et al. The role of tumor microenvironment in cancer metastasis: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Cancers.* 2021. Vol. 13, no. 9. Art. 2053. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13092053>.

26. Reeva H., Mahesh G., Manjunath U. et al. The crucial nexus: unveiling the role of collagen in cancer progression. *Semin Oncol.* 2025. Vol. 52, no. 3. Art. 152346. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seminoncol.2025.152346>.
27. Hu D., Li Z., Zheng B. et al. Cancer-associated fibroblasts in breast cancer: Challenges and opportunities. *Cancer Commun (Lond).* 2022. Vol. 42, no. 5. P. 401–434. DOI: <https://doi.org/10.1002/cac2.12291>.
28. Unsworth A., Anderson R., Britt K. Stromal fibroblasts and the immune microenvironment: partners in mammary gland biology and pathology? *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2014. Vol. 19, no. 2. P. 169–182. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10911-014-9326-8>.
29. De Martino D., Bravo-Cordero J. J. Collagens in Cancer: Structural Regulators and Guardians of Cancer Progression. *Cancer Res.* 2023. Vol. 83, no. 9. P. 1386–1392. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-22-2034>.
30. Kader A., Kaufmann J. O., Mangarova D. B. et al. Collagen-specific molecular magnetic resonance imaging of prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 24, no. 1. Art. 711. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24010711>.
31. Dieci M. V., Miglietta F., Guarneri V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells.* 2021. Vol. 10, no. 2. Art. 223. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10020223>.
32. Hinshaw D. C., Shevde L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. *Cancer Res.* 2019. Vol. 79, no. 18. P. 4557–4566. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-3962>.
33. Inman J. L., Robertson C., Mott J. D. et al. Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development.* 2015. Vol. 142, no. 6. P. 1028–1042. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.087643>.

34. Gong Z., Li Q., Shi J. et al. Lung fibroblasts facilitate pre-metastatic niche formation by remodeling the local immune microenvironment. *Immunity*. 2022. Vol. 55, no. 8. P. 1483–1500.e9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.07.001>.
35. Yuan X., Qian N., Ling S. et al. Breast cancer exosomes contribute to pre-metastatic niche formation and promote bone metastasis of tumor cells. *Theranostics*. 2021. Vol. 11, no. 3. P. 1429–1445. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.45351>.
36. Hu M., Yao J., Cai L. et al. Distinct epigenetic changes in the stromal cells of breast cancers. *Nat Genet*. 2005. Vol. 37, no. 8. P. 899–905. DOI: <https://doi.org/10.1038/ng1596>.
37. Tao S., Chen Q., Lin C. et al. Linc00514 promotes breast cancer metastasis and M2 polarization of tumor-associated macrophages via Jagged1-mediated Notch signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020. Vol. 39, no. 1. P. 1–17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-020-01676-x>.
38. Yang S. S., Ma S., Dou H. et al. Breast cancer-derived exosomes regulate cell invasion and metastasis via miR-146a to activate cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment. *Exp Cell Res*. 2020. Vol. 391, no. 2. Art. 111983. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.111983>.
39. Chen B., Sang Y., Song X. et al. Exosomal miR-500a-5p derived from cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell proliferation and metastasis through targeting USP28. *Theranostics*. 2021. Vol. 11, no. 8. P. 3932–3944. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.53412>.
40. Robertson C. The extracellular matrix in breast cancer predicts prognosis through composition, splicing, and crosslinking. *Exp Cell Res*. 2016. Vol. 343, no. 1. P. 73–81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.11.009>.
41. Yan D., Ju X., Luo B. et al. Tumour stroma ratio is a potential predictor for 5-year disease-free survival in breast cancer. *BMC Cancer*. 2022. Vol. 22, no. 1. Art. 1082. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-022-10183-5>.

42. Dai S., Mo Y., Wang Y. et al. Chronic stress promotes cancer development. *Front Oncol.* 2020. Vol. 10. Art. 1492. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01492>.
43. Chiriac V. F., Baban A., Dumitrascu D. L. Psychological stress and breast cancer incidence: a systematic review. *Clujul Med.* 2018. Vol. 91, no. 1. P. 18–26. DOI: <https://doi.org/10.15386/cjmed-924>.
44. Rømer A. M. A., Thorseth M. L., Madsen D. H. Immune modulatory properties of collagen in cancer. *Front Immunol.* 2021. Vol. 12. Art. 791453. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.791453>.
45. Fang M., Yuan J., Peng C. et al. Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumor Biol.* 2014. Vol. 35. P. 2871–2882. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1511-7>.
46. Yuan Z., Li Y., Zhang S. et al. Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: from mechanisms to treatments. *Mol Cancer.* 2023. Vol. 22, no. 1. Art. 48. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01744-8>.
47. de Almeida L. G. N., Thode H., Eslambolchi Y. et al. Matrix Metalloproteinases: From Molecular Mechanisms to Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2022. Vol. 74, no. 3. P. 712–768. DOI: <https://doi.org/10.1124/pharmrev.121.000349>.
48. Cabral-Pacheco G. A., Garza-Veloz I., Castruita-De la Rosa C. et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, no. 24. Art. 9739. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21249739>.
49. Radisky E. S., Radisky D. C. Matrix metalloproteinases as breast cancer drivers and therapeutic targets. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2015. Vol. 20, no. 7. P. 1144–1163. DOI: <https://doi.org/10.2741/4364>.
50. Wu S., Zhou X., Jin Z. et al. Collagenases and their inhibitors: a review. *Collagen Leather.* 2023. Vol. 5. Art. 19. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42825-023-00126-6>.

51. Pérez-García S., Carrión M., Gutiérrez-Cañas I. et al. Profile of matrix-remodeling proteinases in osteoarthritis: impact of fibronectin. *Cells*. 2019. Vol. 9, no. 1. Art. 40. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells9010040>.
52. Atanasova T., Stankova T., Bivolarska A. et al. Matrix Metalloproteinases in oral health-special attention on MMP-8. *Biomedicines*. 2023. Vol. 11, no. 6. Art. 1514. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11061514>.
53. Li S., Pritchard D. M., Yu L. G. Regulation and function of matrix metalloproteinase-13 in cancer progression and metastasis. *Cancers*. 2022. Vol. 14, no. 13. Art. 3263. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14133263>.
54. Ricard- Blum S., Salza R. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp Dermatol*. 2014. Vol. 23, no. 7. P. 457–463. DOI: <https://doi.org/10.1111/exd.12435>.
55. Maquart F. X., Pasco S., Ramont L. et al. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity: implication in tumor invasion. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004. Vol. 49, no. 3. P. 199–202. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.06.007>.
56. Henke E., Nandigama R., Ergün S. Extracellular matrix in the tumor microenvironment and its impact on cancer therapy. *Front Mol Biosci*. 2020. Vol. 6. Art. 160. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00160>.
57. Mook O. R., Frederiks W. M., Van Noorden C. J. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2004. Vol. 1705, no. 2. P. 69–89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2004.09.006>.
58. Wells J. M., Gaggar A., Blalock J. E. MMP generated matrikines. *Matrix Biol*. 2015. Vol. 44–46. P. 122–129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.01.016>.
59. Xi C., Song Z., Cui Q. et al. Elevated MMP1 Expression in Carcinoma-Associated Fibroblasts of Breast Cancer Contributes to Tumor Progression and Unfavorable Prognosis. *Ann Clin Lab Sci*. 2024. Vol. 54, no. 1. P. 66–75.

60. Soria-Valles C., Gutiérrez-Fernández A., Guiu M. et al. The anti-metastatic activity of collagenase-2 in breast cancer cells is mediated by a signaling pathway involving decorin and miR-21. *Oncogene*. 2014. Vol. 33. P. 3054–3063. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.267>.
61. Juurikka K., Butler G. S., Salo T. et al. The role of MMP8 in cancer: a systematic review. *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, no. 18. Art. 4506. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184506>.
62. Shah F. D., Shukla S. N., Shah P. M. et al. Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. *Indian J Cancer*. 2009. Vol. 46, no. 3. P. 194–202. DOI: <https://doi.org/10.4103/0019-509X.52953>.
63. Quintero-Fabián S., Arreola R., Becerril-Villanueva E. et al. Role of matrix metalloproteinases in angiogenesis and cancer. *Front Oncol*. 2019. Vol. 9. Art. 1370. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01370>.
64. Baldwin S. J., Kreplak L., Lee J. M. MMP-9 selectively cleaves non-D-banded material on collagen fibrils with discrete plasticity damage in mechanically-overloaded tendon. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2019. Vol. 95. P. 67–75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.03.020>.
65. Ruangpanit N., Chan D., Holmbeck K. et al. Gelatinase A (MMP-2) activation by skin fibroblasts: dependence on MT1-MMP expression and fibrillar collagen form. *Matrix Biol*. 2001. Vol. 20, no. 3. P. 193–203. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00135-4](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00135-4).
66. Bates A. L., Pickup M. W., Hallett M. A. et al. Stromal matrix metalloproteinase 2 regulates collagen expression and promotes the outgrowth of experimental metastases. *J Pathol*. 2015. Vol. 235, no. 5. P. 773–783. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.4493>.
67. Gilles C., Newgreen D. F., Sato H. et al. Matrix metalloproteases and epithelial-to-mesenchymal transition. *Rise and Fall of Epithelial Phenotype*. New York : Springer, 2005. P. 297–315. DOI: <https://doi.org/10.1007/0-387-28671-3>.

68. Wang Q., Wang K., Tan X. et al. Immunomodulatory role of metalloproteases in cancers: Current progress and future trends. *Front Immunol.* 2022. Vol. 13. Art. 1064033. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1064033>.
69. Laczko R., Csiszar K. Lysyl Oxidase (LOX): Functional Contributions to Signaling Pathways. *Biomolecules.* 2020. Vol. 10, no. 8. Art. 1093. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10081093>.
70. Cox T. R., Bird D., Baker A. M. et al. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis. *Cancer Res.* 2013. Vol. 73, no. 6. P. 1721–1732. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2233>.
71. Tenti P., Vannucci L. Lysyl oxidases: linking structures and immunity in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2020. Vol. 69. P. 223–235. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02404-x>.
72. Grau-Bove X., Ruiz-Trillo I., Rodriguez-Pascual F. Origin and evolution of lysyl oxidases. *Sci Rep.* 2015. Vol. 5. Art. 10568. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep10568>.
73. Ovchinnikova O. A., Folkersen L., Persson J. et al. The collagen cross-linking enzyme lysyl oxidase is associated with the healing of human atherosclerotic lesions. *J Intern Med.* 2014. Vol. 276, no. 5. P. 525–536. DOI: <https://doi.org/10.1111/joim.12228>.
74. Wang T. H., Hsia S. M., Shieh T. M. Lysyl oxidase and the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2016. Vol. 18, no. 1. Art. 62. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms18010062>.
75. Liburkin-Dan T., Toledano S., Neufeld G. Lysyl oxidase family enzymes and their role in tumor progression. *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, no. 11. Art. 6249. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23116249>.

76. Peinado H., Del Carmen Iglesias-de la Cruz M., Olmeda D. et al. A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in Snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* 2005. Vol. 24. P. 3446–3458. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600781>.
77. Tang H., Leung L., Saturno G. et al. Lysyl oxidase drives tumour progression by trapping EGF receptors at the cell surface. *Nat Commun.* 2017. Vol. 8. Art. 14909. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms14909>.
78. Lukianova N., Mushii O., Borikun T. et al. Pattern of MMP2 and MMP9 expression depends on breast cancer patients' age. *Exp Oncol.* 2023. Vol. 45, no. 1. P. 17–27. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.01.017>.
79. Saby C., Rammal H., Magnien K. et al. Age-related modifications of type I collagen impair DDR1-induced apoptosis in non-invasive breast carcinoma cells. *Cell Adh Migr.* 2018. Vol. 12, no. 4. P. 335–347. DOI: <https://doi.org/10.1080/19336918.2018.1472182>.
80. Ren F., Tang R., Zhang X. et al. Overexpression of MMP Family Members Functions as Prognostic Biomarker for Breast Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015. Vol. 10, no. 8. Art. e0135544. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135544>.
81. Hammash D., Mahfood M., Khoder G. et al. miR-623 Targets Metalloproteinase-1 and Attenuates Extravasation of Brain Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2022. Vol. 14. P. 187–198. DOI: <https://doi.org/10.2147/BCTT.S372083>.
82. Soroushanova A., Delgado L. M., Wu Z. et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater.* 2019. Vol. 31, no. 1. Art. e1801651. DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>.

83. Despotović S. Z., Milićević Đ. N., Krmpot A. J. et al. Altered organization of collagen fibers in the uninvolved human colon mucosa 10 cm and 20 cm away from the malignant tumor. *Sci Rep.* 2020. Vol. 10. Art. 6359. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63368-y>.
84. Byrne C. E., Decombe J. B., Bingham G. C. et al. Evaluation of Extracellular Matrix Composition to Improve Breast Cancer Modeling. *Tissue Eng Part A.* 2021. Vol. 27, no. 7–8. P. 500–511. DOI: <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2020.0364>.
85. Shi R., Zhang Z., Zhu A. et al. Targeting type I collagen for cancer treatment. *Int J Cancer.* 2022. Vol. 151, no. 5. P. 665–683. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.33985>.
86. Bou-Gharios G., Abraham D., de Crombrughe B. Type I collagen structure, synthesis, and regulation. *Principles of Bone Biology* / eds. J. P. Bilezikian, T. J. Martin, T. L. Clemens, C. J. Rosen. 4th ed. Elsevier, 2020. P. 295–337. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814841-9.00013-0>.
87. Provenzano P. P., Eliceiri K. W., Campbell J. M. et al. Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* 2006. Vol. 4. Art. 38. DOI: <https://doi.org/10.1186/1741-7015-4-38>.
88. Schrader J., Gordon-Walker T. T., Aucott R. L. et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology.* 2011. Vol. 53, no. 4. P. 1192–1205. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.24108>.
89. Kuivaniemi H., Tromp G. Type III collagen (COL3A1): Gene and protein structure, tissue distribution, and associated diseases. *Gene.* 2019. Vol. 707. P. 151–171. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.05.003>.
90. Niederreither K., D'Souza R., Metsäranta M. et al. Coordinate patterns of expression of type I and III collagens during mouse development. *Matrix Biol.* 1995. Vol. 14, no. 9. P. 705–713. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(05\)80013-7](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(05)80013-7).

91. Henkel W., Glanville R. W. Covalent crosslinking between molecules of type I and type III collagen. *Eur J Biochem.* 1982. Vol. 122, no. 1. P. 205–213. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1982.tb05868.x>.
92. Liu X., Wu H., Byrne M. et al. Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997. Vol. 94, no. 5. P. 1852–1856. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.94.5.1852>.
93. Di Martino J. S., Nobre A. R., Mondal C. et al. A tumor-derived type III collagen-rich ECM niche regulates tumor cell dormancy. *Nat Cancer.* 2022. Vol. 3, no. 1. P. 90–107. DOI: <https://doi.org/10.1038/s43018-021-00291-9>.
94. Liu X., Li H., Wang T. et al. Recombinant humanized collagen type III with high antitumor activity inhibits breast cancer cells autophagy, proliferation, and migration through DDR1. *Int J Biol Macromol.* 2023. Vol. 243. Art. 125130. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125130>.
95. Zhang H., Ding C., Li Y. et al. Data mining-based study of collagen type III alpha 1 (COL3A1) prognostic value and immune exploration in pan-cancer. *Bioengineered.* 2021. Vol. 12, no. 1. P. 3634–3646. DOI: <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1949838>.
96. Xu S., Xu H., Wang W. et al. The role of collagen in cancer: from bench to bedside. *J Transl Med.* 2019. Vol. 17, no. 1. Art. 309. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2058-1>.
97. Keikhosravi A., Li B., Liu Y. et al. Non-disruptive collagen characterization in clinical histopathology using cross-modality image synthesis. *Commun Biol.* 2020. Vol. 3, no. 1. Art. 414. DOI: <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01151-5>.
98. Falzon G., Pearson S., Murison R. Analysis of collagen fibre shape changes in breast cancer. *Phys Med Biol.* 2008. Vol. 53, no. 23. P. 6641–6652. DOI: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/53/23/001>.

99. Lukianova N., Zadvornyi T., Mushii O. et al. Evaluation of diagnostic algorithm based on collagen organization parameters for breast tumors. *Exp Oncol*. 2022. Vol. 44, no. 4. P. 281–286. DOI: <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-4.19137>.
100. Brabrand A., Kariuki I. I., Engstrøm M. J. et al. Alterations in collagen fibre patterns in breast cancer. A premise for tumour invasiveness? *APMIS*. 2015. Vol. 123, no. 1. P. 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12298>.
101. Bodelon C., Mullooly M., Pfeiffer R. M. et al. Mammary collagen architecture and its association with mammographic density and lesion severity among women undergoing image-guided breast biopsy. *Breast Cancer Res*. 2021. Vol. 23, no. 1. Art. 105. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01482-z>.
102. Gole L., Yeong J., Lim J. C. T. et al. Quantitative stain-free imaging and digital profiling of collagen structure reveal diverse survival of triple negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res*. 2020. Vol. 22, no. 1. Art. 42. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01282-x>.
103. Hanley C. J., Noble F., Ward M. et al. A subset of myofibroblastic cancer-associated fibroblasts regulate collagen fiber elongation, which is prognostic in multiple cancers. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, no. 5. P. 6159–6174. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6740>.
104. Xi G., Qiu L., Xu S. et al. Computer-assisted quantification of tumor-associated collagen signatures to improve the prognosis prediction of breast cancer. *BMC Med*. 2021. Vol. 19, no. 1. Art. 273. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02146-7>.
105. Xi G., Guo W., Kang D. et al. Large-scale tumor-associated collagen signatures identify high-risk breast cancer patients. *Theranostics*. 2021. Vol. 11, no. 7. P. 3229–3243. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.55921>.

106. Morkunas M., Zilenaite D., Laurinaviciene A. et al. Tumor collagen framework from bright-field histology images predicts overall survival of breast carcinoma patients. *Sci Rep.* 2021. Vol. 11, no. 1. Art. 15474. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94862-6>.
107. Sprague B. L., Vacek P. M., Mulrow S. E. et al. Collagen Organization in Relation to Ductal Carcinoma In Situ Pathology and Outcomes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2021. Vol. 30, no. 1. P. 80–88. DOI: <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-20-0889>.
108. Mostaço-Guidolin L. B., Ko A. C., Wang F. et al. Collagen morphology and texture analysis: from statistics to classification. *Sci Rep.* 2013. Vol. 3. Art. 2190. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep02190>.
109. McDonald E. S., Clark A. S., Tchou J. et al. Clinical diagnosis and management of breast cancer. *J Nucl Med.* 2016. Vol. 57. P. 9S–16S. DOI: <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>.
110. Dumas D., Werkmeister E., Hupont S. et al. Non-invasive second harmonic generation (SHG) in macroscopy (MacroSHG) as bio-diagnosis to image collagen network organization in extracellular matrix. *Engineering.* 2014. Vol. 6, no. 8. P. 485–490. DOI: <https://doi.org/10.4236/eng.2014.68050>.
111. Gailhouste L., Le Grand Y., Odin C. et al. Fibrillar collagen scoring by second harmonic microscopy: a new tool in the assessment of liver fibrosis. *J Hepatol.* 2010. Vol. 52, no. 3. P. 398–406. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.12.009>.
112. Golaraei A., Kontenis L., Cisek R. et al. Changes of collagen ultrastructure in breast cancer tissue determined by second-harmonic generation double Stokes-Mueller polarimetric microscopy. *Biomed Opt Express.* 2016. Vol. 7, no. 10. P. 4054–4068. DOI: <https://doi.org/10.1364/BOE.7.004054>.
113. Rittié L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods Mol Biol.* 2017. Vol. 1627. P. 395–407. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_26.

114. Liu Y., Keikhosravi A., Mehta G. S. et al. Methods for quantifying fibrillar collagen alignment. *Methods Mol Biol.* 2017. Vol. 1627. P. 429–451. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7113-8_28.
115. Marcos-Garcés V., Harvat M., Molina Aguilar P. et al. Comparative measurement of collagen bundle orientation by Fourier analysis and semiquantitative evaluation: reliability and agreement in Masson's trichrome, Picrosirius red and confocal microscopy techniques. *J Microsc.* 2016. Vol. 267, no. 2. P. 130–142. DOI: <https://doi.org/10.1111/jmi.12553>.
116. Dziedzic-Goclawska A., Rozycka M., Czyba J. C. et al. Application of the optical Fourier transform for analysis of the spatial distribution of collagen fibers in normal and osteopetrotic bone tissue. *Histochemistry.* 1982. Vol. 74, no. 1. P. 123–137. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00495058>.
117. Chekhun V. SYMBIOSIS OF MEDICAL TECHNOLOGIES AND ARTIFICIAL INTELLIGENCE: NEW OPPORTUNITIES IN ONCOLOGY. *Exp Oncol.* 2022. Vol. 44, no. 2. P. 90–92. DOI: <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-2.17951>.
118. Ritika B., Aneecia G., Apoorva C. Detection of breast cancer using neural networks: a review. *J Clin Biomed Sci.* 2015. Vol. 5, no. 4. P. 143–148.
119. Agrawal S., Agrawal J. Neural network techniques for cancer prediction: a survey. *Procedia Comput Sci.* 2015. Vol. 60. P. 769–774. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.08.234>.
120. Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993. Vol. 75, no. 5. P. 843–854. DOI: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y).
121. Sempere L. F. Celebrating 25 Years of MicroRNA Research: From Discovery to Clinical Application. *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20, no. 8. Art. 1987. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20081987>.
122. Borikun T., Mushii O., Pavlova A. et al. Tumor microenvironment-associated miR-7-5p, miR-19a-3p, and miR-23b-3p expression in prostate

- cancer with different progression risk. *Exp Oncol*. 2024. Vol. 45, no. 4. P. 432–442. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.04.432>.
123. Zadvornyi T., Lukianova N., Borikun T. et al. Mast cells as a tumor microenvironment factor associated with the aggressiveness of prostate cancer. *Neoplasma*. 2022. Vol. 69, no. 6. P. 1490–1498. DOI: https://doi.org/10.4149/neo_2022_221014N1020.
 124. Zhou Y., Ren H., Dai B. et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatic stellate cells to cancer-associated fibroblasts. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018. Vol. 37, no. 1. Art. 324. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0965-2>.
 125. Mushii O., Pavlova A., Bazas V. et al. Mast Cells as a Factor in Regulation of Breast Cancer Stromal Component Associated with Breast Cancer Aggressiveness. *Exp Oncol*. 2025. Vol. 46, no. 4. P. 311–323. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.04.311>.
 126. Chekhun V., Borikun T., Mushii O. et al. Expression profile of miR-145, -182, -21, -27a, -29b, and -34a in breast cancer patients of young age. *Exp Oncol*. 2024. Vol. 45, no. 4. P. 421–431. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.04.421>.
 127. Anguiano M., Castilla C., Maska M. et al. Characterization of the role of collagen network structure and composition in cancer cell migration. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*. 2015. Vol. 2015. P. 8139–8142. DOI: <https://doi.org/10.1109/EMBC.2015.7320283>.
 128. Chekhun V., Martyniuk O., Lukianova Y. et al. Features of breast cancer in patients of young age: search for diagnosis optimization and personalized treatment. *Exp Oncol*. 2023. Vol. 45, no. 2. P. 139–150. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.02.139>.
 129. Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T. et al. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. *Exp Oncol*. 2023. Vol. 45, no. 3. P. 351–363. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.03.351>.

130. Lukianova N., Mushii O., Zadvornyi T. et al. Development of an algorithm for biomedical image analysis of the spatial organization of collagen in breast cancer tissue of patients with different clinical status. *FEBS Open Bio*. 2024. Vol. 14, no. 4. P. 675–686. DOI: <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13773>.
131. Lukianova N., Mushii O., Zadvornyi T. et al. Features of collagenase gene expression in breast cancer tissue: an open databases analysis. *Oncology*. 2024. Vol. 26, no. 1. P. 22–28. DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2024.01.022>.
132. Задворний Т. В., Бурда Т. С., Мушій О. М. та ін. Роль стресорних факторів у модуляції експресії та функціональної активності матриксних металопротеїназ. *Онкологія*. 2025. Т. 27, № 2. С. 111–118. DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2025.02.111>.
133. Martyniuk O., Mushii O., Pavlova A. Integrated analysis of hsa-miR-26b-5p and hsa-miR-186-5p in blood serum and tumor tissue reveals their prognostic and predictive significance in breast cancer. *Exp Oncol*. 2026. Vol. 48, no. 1. P. 31–39. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2026.01.031>.
134. Chekhun V., Lukianova Y., Mushii O. et al. Breast cancer microenvironment composition associated with high PD-L1 expression. *BMC Cancer*. 2026. Vol. 26. Art. 217. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-026-15542-0>.
135. Mushii O. M., Burda T. S., Shevchuk A. O. et al. Collagen matrix remodelling as a factor of tumour progression aggressiveness: the role of proteases and cross-linking enzymes. *Oncology*. 2026. Vol. 28, no. 2. P. 97–111. DOI: <https://doi.org/10.15407/oncology.2026.02.097>.

136. Колагени як предиктивні маркери ефективності хіміотерапевтичного лікування хворих на рак молочної залози молодого віку : методичні рекомендації / В. Ф. Чехун, Н. Ю. Лук'янова, Є. В. Кашуба та ін. Київ, 2023. 21 с. URL: <https://www.iepor.site/wp-content/uploads/2024/04/2.pdf> (дата звернення: 26.07.2026).

ДОДАТОК А



Ігор ДМИТРЕНКО

"21" червня 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування ризику рецидиву у хворих на рак молочної залози молодого віку

2. **Устова-розробник, автори:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Чехун В.Ф., Мушій О.М., Задворний Т.В., Борікун Т.В., Мартинюк О.М. та ін.

Івано-Франківський національний медичний університет, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; Крижанівська А.С., Дяків І. Б., Андрійів А.В.

3. Джерело інформації: Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., Borikun T., Martyniuk O., Kashuba E., Kryzhanivska A., Andriiv A., Diakiv I., Lukianova N. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. Exp Oncol. 2023; 45(3): 351-363.

4. Впроваджено в 2023 р. у КНП «Прикарпатський клінічний онкологічний центр Івано-Франківської обласної ради»

5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023

6. Загальна кількість спостережень 12

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

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

8. Зауваження, пропозиції немає

"21" "12" 2023 р.

Завідувач відділення

Юрій СТИНСЬКИЙ
гормонально-ендокринний відділення у жінок



генеральний директор
КНП «Прикарпатський клінічний
онкологічний центр» ІФ ОР

Ігор ДМИТРЕНКО

"21" серпня 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку

2. **Устнови-розробники, автори:**

- Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Чехун В.Ф., Мушій О.М., Задворний Т.В., Борікун Т.В., Мартинюк О.М. та ін.

- Івано-Франківський національний медичний університет, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; Крижанівська А.С., Дяків І.Б., Андрійв А.В.

3. Джерело інформації: Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., Borikun T., Martyniuk O., Kashuba E., Kryzhanivska A., Andriiv A., Diakiv I., Lukianova N. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. Exp Oncol. 2023; 45(3): 351-363.

4. Впроваджено в 2023 р. у КНП «Прикарпатський клінічний онкологічний центр Івано-Франківської обласної ради»

5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023

6. Загальна кількість спостережень 16

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

№№ з/п	Показники ефективності	За даними розробників	За даними організації, що впроваджує
1.	Клінічні показники: <i>Результати лікування:</i> - безпосередні (оцінка регресії новоутворень за шкалою ВООЗ)(%); - досягнення клінічної ремісії (тривалість безрецидивного періоду)	16 10	17 11
2.	Соціальні: - покращання якості життя хворого	12	13

8. Зауваження, пропозиції немає

"21" 12 2023 р.

Завідувач відділення

Юрій СТИНСЬКИЙ

гормонально-залежних пухлин у жінок



 "Затверджую"

 генеральний директор
 КНП «Прикарпатський клінічний
 онкологічний центр» ІФ ОР
 Ігор ДМИТРЕНКО
 "11" грудня 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку
2. **Устнова-розробник, автори:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Лук'янова Н.Ю., Задворний Т.В., Мушій О.М., Пятчанина Т.В., Чехун В.Ф.
3. Джерело інформації: Lukianova N., Zadvornyi T., Mushii O., Pyatchanina T., Chekhun V. Approbation of algorithm for the assessment of collagen organization parameters in breast tumors. *Exp Oncol.* 2022;44(4):281-286.
4. Впроваджено в 2023 р. у КНП «Прикарпатський клінічний онкологічний центр Івано-Франківської обласної ради»
5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023
6. Загальна кількість спостережень 9
7. Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

№№ з/п	Показники ефективності	За даними розробників	За даними організації, що впроваджує
1.	Клінічні показники: <i>Результати лікування:</i> - безпосередні (оцінка регресії новоутворень за шкалою ВООЗ),(%); - досягнення клінічної ремісії (тривалість безрецидивного періоду)	15 11	17 13
2.	Соціальні: - покращання якості життя хворого; - збільшення тривалості життя онкологічного хворого (виживаності), (місяців, років)	10 14	14 14

8. Зауваження, пропозиції немає
 .. 12 2023 р.

Завідувач відділення _____


 Світлана ГОРОШКО
 завідувачка хіміотерапевтичним відділом

"Затверджую"
В.о.Генеральний директор
Кондратенко А.В.
2023 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку

2. **Устнови-розробники, автори:**

1. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45;
Чехун В.Ф., Мухий О.М., Задворний Т.В., Борікун Т.В., Мартинюк О.М. та ін.
2. Івано-Франківський національний медичний університет, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; Крижанівська А.Є., Дяків І. Б., Андріїв А.В.
3. Джерело інформації: Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., Borikun T., Martyniuk O., Kashuba E., Kryzhanivska A., Andriiv A., Diakiv I., Lukianova N. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. Exp Oncol. 2023; 45(3): 351-363.
4. Впроваджено в 2023 р. у КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр»
5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023
6. Загальна кількість спостережень: 15
7. Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

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

8. Зауваження, пропозиції немає

“ ” 2023 р.

Завідувач відділення САХІД

Клюсов А.О.

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

"Затверджено"
В.о. Генеральний директор
Кондратенко А.В.
" _____ 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування ризику рецидиву у хворих на рак молочної залози молодого віку
2. **Устнова-розробник, автори:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Чехун В.Ф., Мушій О.М., Задворний Т.В., Борікун Т.В., Мартинюк О.М. та ін. Івано-Франківський національний медичний університет, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; Крижанівська А.С., Дяків І. Б., Андрійв А.В.
3. Джерело інформації: Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., Borikun T., Martyniuk O., Kashuba E., Kryzhanivska A., Andriiv A., Diakiv I., Lukianova N. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. *Exp Oncol.* 2023; 45(3): 351-363.
4. Впроваджено в 2023 р. у КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр»
5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023
6. Загальна кількість спостережень 13
7. Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

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

8. Зауваження, пропозиції немає

_____ 2023 р.

Завідувач відділення САХІД

Клюсов А.О.

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

"Затверджую"

В.о.Генеральний директор

Кондратенко А.В.

" " 2023 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку

2. **Устнова-розробник, автори:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Лук'янова Н.Ю., Задворний Т.В., Мушій О.М., Пятчанина Т.В., Чехун В.Ф.

3. **Джерело інформації:** Lukianova N., Zadvornyi T, Mushii O, Pyatchanina T, Chekhun V. Approbation of algorithm for the assessment of collagen organization parameters in breast tumors. Exp Oncol. 2022;44(4):281-286.

4. Впроваджено в 2023 р. у КНП «Київський міський клінічний онкологічний центр»

5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023

6. Загальна кількість спостережень 21

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

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

8. Зауваження, пропозиції немає

" " 2023 р.

Завідувач відділення САХІД

Клюсов А.О.

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



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ 22 ГРУ 2023

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку
2. **Устнови-розробники, автори:**
 1. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45;
 - Чехун В.Ф., Мушій О.М., Задворний Т.В., Борікун Т.В., Мартинюк О.М. та ін.
 2. Івано-Франківський національний медичний університет, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; Крижанівська А.С., Дяків І. Б., Андріїв А.В.
 3. Джерело інформації: Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., Borikun T., Martyniuk O., Kashuba E., Kryzhanivska A., Andriiv A., Dia kiv I., Lukianova N. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. Exp Oncol. 2023; 45(3): 351-363.
 4. Впроваджено в 2023 р. у КНІП КОР «Київський обласний онкологічний диспансер»
 5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023
 6. Загальна кількість спостережень 8
 7. Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

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

8. Зауваження, пропозиції немає

22 „ 8/1 2023 р.

Завідувач 2 онкохірургічним відділенням КНІП КОР "КООД"

Грибач С.М.

"Затверджую"
 Генеральний директор КНП КОР
 "КООД"
 Арешкович А.О.

2023 р.р.

22 ГРУ 2023

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку

2. **Устнова-розробник, автори:** Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45; Лук'янова Н.Ю., Задворний Т.В., Мушій О.М., Пятчанина Т.В., Чехун В.Ф.

3. Джерело інформації: Lukianova N., Zadvornyi T., Mushii O., Pyatchanina T., Chekhun V. Approbation of algorithm for the assessment of collagen organization parameters in breast tumors. Exp Oncol. 2022;44(4):281-286.

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 10

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

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

8. Зауваження, пропозиції немає

„22” ХГ 2023 р.

Завідувач 2 онкохірургічним відділенням КНП КОР "КООД" _____ Грибач С.М.



"Затверджую"

Генеральний директор КНП КОР
"КООД"
Арешкович А.О.

2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ 22 ГРУ 2023

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування ризику рецидиву 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., Мушій О.М., Задворний Т.В., Борікун Т.В., Мартинюк О.М. та ін. Івано-Франківський національний медичний університет, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; Крижанівська А.Є., Дяків І. Б., Андріїв А.В.

3. Джерело інформації: Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., Borikun T., Martyniuk O., Kashuba E., Kryzhanivska A., Andriiv A., Diakiv I., Lukianova N. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. Exp Oncol. 2023; 45(3): 351-363.

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 12

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

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

8. Зауваження, пропозиції немає

"22" "XII" 2023 р.

Завідувач 2 онкохірургічним відділенням КНП КОР "КООД"

Грибач С.М.

"Затверджую"
 Генеральний директор
 Єфіменко О.В.
 " " 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва впровадження:** Спосіб прогнозування перебігу пухлинного процесу у хворих на рак молочної залози молодого віку

2. **Устнови-розробники, автори:**

1. Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 45;

Чехун В.Ф., Мушій О.М, Задворний Т.В., Борікун Т.В., Мартинюк О.М. та ін.

2. Івано-Франківський національний медичний університет, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; Крижанівська А.Є., Дяків І. Б., Андрійв А.В.

3. Джерело інформації: Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., Borikun T., Martyniuk O., Kashuba E., Kryzhanivska A., Andriiv A., Diakiv I., Lukianova N. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. Exp Oncol. 2023; 45(3): 351-363.

4. Впроваджено в 2023 р. у ДНП «Національний інститут раку» МОЗ України

5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023

6. Загальна кількість спостережень 12

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

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

8. Зауваження, пропозиції немає

" " 2023 р.

Завідувач відділення

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

"Затверджую"
Генеральний директор
Єфіменко О.В.

" " 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- Назва впровадження:** Спосіб прогнозування 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; Лук'янова Н.Ю., Задворний Т.В., Мушій О.М., Пятчанина Т.В., Чехун В.Ф.
- Джерело інформації:** Lukianova N., Zadvornyi T, Mushii O, Pyatchanina T, Chekhun V. Approbation of algorithm for the assessment of collagen organization parameters in breast tumors. Exp Oncol. 2022;44(4):281-286.
- Впроваджено в 2023 р. у ДНП «Національний інститут раку» МОЗ України**
- Строки впровадження** з 01.01.2023 по 31.12.2023
- Загальна кількість спостережень** 10
- Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації**

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

8. Зауваження, пропозиції немає

" " 2023 р.

Завідувач відділення

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

"Затверджую"
Генеральний директор
Єфіменко О.В.

" 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Назва впровадження: Спосіб прогнозування ризику рецидиву 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., Мушій О.М., Задворний Т.В., Борікун Т.В., Мартинюк О.М. та ін. Івано-Франківський національний медичний університет, 76018, м. Івано-Франківськ, вул. Галицька, 2; Крижанівська А.Є., Дяків І. Б., Андріїв А.В.
3. Джерело інформації: Chekhun V., Mushii O., Zadvornyi T., Borikun T., Martyniuk O., Kashuba E., Kryzhanivska A., Andriiv A., Diakiv I., Lukianova N. Features of COL1A1 expression in breast cancer tissue of young patients. Exp Oncol. 2023; 45(3): 351-363.
4. Впроваджено в 2023 р. у ДНП «Національний інститут раку» МОЗ України
5. Строки впровадження з 01.01.2023 по 31.12.2023
6. Загальна кількість спостережень 16
7. Ефективність впровадження у відповідності до критеріїв, викладених в джерелі інформації

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

8. Зауваження, пропозиції немає

" 2023 р.

Завідувач відділення

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

ДОДАТОК Б

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ
ДИСЕРТАЦІЇ

1. Lukianova, N., Zadvornyi, T., Mushii, O., Pyatchanina, T., & Chekhun, V. (2022). EVALUATION OF DIAGNOSTIC ALGORITHM BASED ON COLLAGEN ORGANIZATION PARAMETERS FOR BREAST TUMORS. *Experimental oncology*, 44(4), 281–286. <https://doi.org/10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-44-no-4.19137>
2. Chekhun, V., Martynyuk, O., Lukianova, Y., Mushii, O., Zadvornyi, T., & Lukianova, N. (2023). FEATURES OF BREAST CANCER IN PATIENTS OF YOUNG AGE: SEARCH FOR DIAGNOSIS OPTIMIZATION AND PERSONALIZED TREATMENT. *Experimental oncology*, 45(2), 139–150. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.02.139>
3. Chekhun, V., Mushii, O., Zadvornyi, T., Borikun, T., Martyniuk, O., Kashuba, E., Kryzhanivska, A., Andriiv, A., Diakiv, I., & Lukianova, N. (2023). FEATURES OF COL1A1 EXPRESSION IN BREAST CANCER TISSUE OF YOUNG PATIENTS. *Experimental oncology*, 45(3), 351–363. <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2023.03.351>
4. Lukianova, N., Mushii, O., Zadvornyi, T., & Chekhun, V. (2024). Development of an algorithm for biomedical image analysis of the spatial organization of collagen in breast cancer tissue of patients with different clinical status. *FEBS open bio*, 14(4), 675–686. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13773>
5. Lukianova, N., Mushii, O., Zadvornyi, T., Borikun, T., Pavlova, A., Kunska, L., & Chekhun, V. (2024). Features of col-lagenase gene expression in breast cancer tissue: an open databases analysis. *Oncology*, 26(1), 22-8.

6. Задворний, Т. В., Бурда, Т. С., Мушій, О. М., Базась, В. М., Павлова, А. О., Шепеленко, І. В., & Лук'янова, Н. Ю. (2025). Роль стресорних факторів у модуляції експресії та функціональної активності матриксних металопротеїназ. *Oncology*, 27(2), 111-118.
7. Martyniuk, O., Mushii, O., & Pavlova, A. (2026). Integrated Analysis of hsa-miR-26b-5p and hsa-miR-186-5p in Blood Serum and Tumor Tissue Reveals their Prognostic and Predictive Significance in Breast Cancer. *Experimental oncology*, 48(1), 31-39.
8. Chekhun, V., Lukianova, Y., Mushii, O., Zadvornyi, T., Pavlova, A., Burda, T., ... & Lukianova, N. (2026). Breast cancer microenvironment composition associated with high PD-L1 expression. *BMC cancer*.
9. Mushii O.M., Burda T.S., Shevchuk A.O., Kokoilo M.V., Levenets A.Yu., Zadvornyi T.V. Collagen matrix remodelling as a factor tumour progression aggressiveness: the role of proteases and cross-linking enzymes. *Онкологія*. 2026. 28, No 2. С. 97–111.
<https://doi.org/10.15407/oncology.2026.02.097>
10. Oleksandr Mushii, Taras Zadvornyi, Nataliia Lukianova, Vasyl Chekhun. Collagen extracellular matrix quantitative parameters in benign and malignant breast cancer neoplasms. BSI Science and Society Conference 2023.
11. Oleksandr Mushii, Taras Zadvornyi, Tetiana Borikun, Olena Martyniuk, Yelyzaveta Lukianova, Vasyl Chekhun. Prognostic and predictive value of COL1A1 in breast cancer patients of young age. 1st International Conference for Doctoral Students and Young Scientists, "OncoPhD", Lublin, October 20-22, 2023
12. Oleksandr Mushii, Taras Zadvornyi, Nataliia Lukianova, Vasyl Chekhun. Correlation between collagen fiber morphometric parameters and aggressiveness of breast cancer. International Scientific Conferences on Medicine & Public Health, Research Week 2023, Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia
13. Oleksandr Mushii, Olena Martyniuk, Taras Zadvornyi, Tetiana Borikun, Anastasiia Koziaruk, Yelyzaveta Lukianova, Vasyl Chekhun. Prognostic Role of COL1A1 in Young Age Breast Cancer Patients. Науково-практична

конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку», 8-10 листопада 2023, Чернівці.

14. Mushii O., Lukianova N., Zadvornyi T., Pavlova A., Martyniuk O., Chekhun V. Differential expression of matrix metalloproteinases in benign and malignant mammary gland tissue. XX міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології», 18-20 квітня 2024, Львів.

15. Shevchuk A., Mushii O., Zadvornyi T. Study of collagenase gene expression profiles in breast cancer: bioinformatic open data analysis. XXI International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: advancements in life sciences», Kyiv, 24-26 April, 2024.

16. Oleksandr Mushii, Taras Zadvornyi, Anastasiia Shevchuk, Vasyl Chekhun. The relationship between collagen matrix remodeling proteins and the clinical status of breast cancer patients. International Research Conference On Medical And Health Care Sciences «Knowledge for Use in practice», 26-28 March 2025, Riga, Latvia.

17. Mushii O., Zadvornyi T., Burda T., Shevchuk A., Pavlova A. MicroRNA-Based Multiple Logistic Regression Models for Predicting Molecular Subtypes of Breast Cancer. 11th BSI Science and Society Conference 2026.

18. Методичні рекомендації. «Колагени як предиктивні маркери ефективності хіміотерапевтичного лікування хворих на рак молочної залози молодого віку» (В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, Є.В. Кашуба, Т.В. Борікун, Т.В. Задворний, В.М. Базась, А.О. Павлова, О.М. Мушій, І.В. Шепеленко, І.М. Тодор, А.Є. Крижанівська, І.Б. Дяків, А.В. Андріїв//Київ, 2023. – 21 с.)
<https://www.iepor.site/wp-content/uploads/2024/04/2.pdf>

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. BSI Science and Society Conference 2023 (постерна доповідь).
2. 1st International Conference for Doctoral Students and Young Scientists, "OncoPhD", Lublin, October 20-22, 2023 (пленарна доповідь).

3. International Scientific Conferences on Medicine & Public Health, Research Week 2023, Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia (постерна доповідь).
4. Науково-практична конференція «Молодіжна наука заради миру та розвитку», 8-10 листопада 2023, Чернівці. (пленарна доповідь).
5. XX міжнародна наукова конференція студентів і аспірантів «Молодь і поступ в біології», 18-20 квітня 2024, Львів. (пленарна доповідь).
6. XXI International conference of students and young scientists «Shevchenkivska vesna: advancements in life sciences», Kyiv, 24-26 April, 2024. (постерна доповідь).
7. International Research Conference On Medical And Health Care Sciences «knowledge for use in practice», 26-28 March 2025, Riga, Latvia. (постерна доповідь).
8. 11th BSI Science and Society Conference 2026. (постерна доповідь).