

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

ПАВЛОВА АННА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 618.19-006.6-018:577.2:577.27

ДИСЕРТАЦІЯ

**РОЛЬ МАКРОФАГАЛЬНОГО ТА МАСТОЦИТАРНОГО СТРОМАЛЬНО-
ІМУННОГО МІКРООТОЧЕННЯ В ОЦІНЦІ СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ
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

_____ А.О. Павлова

Науковий керівник Лук'янова Наталія Юріївна, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Павлова А.О. Роль макрофагального та мастоцитарного стромально-імунного мікрооточення в оцінці ступеня злоякісності раку молочної залози.

– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії у 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) є одним із найпоширеніших онкологічних захворювань і характеризується значною клінічною та молекулярно-біологічною неоднорідністю. Незважаючи на прогрес у ранній діагностиці, молекулярній класифікації та системній терапії, РМЗ посідає провідне місце у структурі онкологічної смертності. Несприятливий прогноз зумовлюють біологічна гетерогенність пухлин, розвиток метастазів, резистентність до лікування та варіабельність клінічного перебігу, що визначає необхідність пошуку нових біомаркерів й удосконалення персоналізованих підходів до лікування.

Встановлено, що прогресування РМЗ залежить не лише від властивостей злоякісно трансформованих клітин, а й від особливостей пухлинного мікрооточення, до складу якого входять пухлинно-асоційовані макрофаги, мастоцити, фібробласти, ендотеліальні клітини, компоненти позаклітинного матриксу, цитокіни, фактори росту та регуляторні некодуючі РНК. Їх взаємодія координує ангіогенез, інвазію, метастазування, формування імуносупресії та терапевтичної резистентності. Водночас інтегральна роль цих компонентів у формуванні агресивного фенотипу РМЗ залишається недостатньо вивченою.

Особливий інтерес становлять макрофаги та мастоцити як функціонально пластичні клітини імунного мікрооточення. М2-подібні макрофаги асоціюються з пригніченням протипухлинної відповіді,

стимуляцією ангиогенезу та ремоделюванням позаклітинного матриксу. Біологічна роль мастоцитів є неоднозначною і залежить від їх локалізації у пухлинному вогнищі, функціонального стану та взаємодії з іншими компонентами мікрооточення.

Важливими модуляторами клітинно-стромальних взаємодій є матрицелюлярні протеїни остеопонтин (OPN) та остеонектин (ON), кодовані генами *SPP1* і *SPARC*. Вони беруть участь у регуляції адгезії, міграції, проліферації, ангиогенезу, епітеліально-мезенхімального переходу та функціональної активності імунних клітин. Значний інтерес становить вісь *SPP1*–макрофаги як потенційний механізм формування імуносупресивного мікрооточення. Функціональний стан мікрооточення також визначається балансом IL-6 та IL-10, які регулюють запальну відповідь, проліферацію пухлинних клітин та активність макрофагів. Враховуючи вищезазначене, доцільним є комплексний аналіз імунної інфільтрації, матрицелюлярних факторів, цитокінового профілю та регуляторних мікроРНК що може сприяти виявленню характерних молекулярно-клітинних ознак, асоційованих з агресивністю РМЗ. Дисертаційна робота присвячена ідентифікації клітинних та молекулярних патернів стромально-імунного мікрооточення, асоційованих зі ступенем злоякисності РМЗ.

Дослідження виконано на клінічному матеріалі хворих на РМЗ I–II стадій із використанням морфологічних, гістохімічних, імуногістохімічних, імуноферментних, молекулярно-біологічних, біоінформатичних і статистичних методів. Проведено комплексну оцінку макрофагального та мастоцитарного компонентів пухлинного мікрооточення, вивчено експресію матрицелюлярних протеїнів і відповідних генів, рівнів IL-6 та IL-10, а також регуляторних мікроРНК з урахуванням основних клініко-патологічних характеристик РМЗ.

Показано, що тканина РМЗ характеризувалася дворазовим підвищенням загальної щільності мастоцитів порівняно з фіброаденомами, а кількість інтратуморальних клітин була більшою у 5,9 раза. Водночас індекс

дегрануляції у фіброаденомах перевищував показник РМЗ на 34%, що свідчить про необхідність розмежованої оцінки кількості, локалізації та функціонального стану мастоцитів. За наявності категорії Т1 виявлено вищу інтратуморальну інфільтрацію, тоді як при Т2, N⁺, G3 і за негативного статусу рецептора прогестерону (PR) відзначено посилення дегрануляції МС. Метастатичне ураження регіонарних лімфатичних вузлів супроводжувалося збільшенням стромальної інфільтрації, а у G3-новоутвореннях – зменшенням загальної та інтратуморальної кількості МС на тлі зростання їх стромальної представленості. Індекс зрілості не корелював із кількістю, локалізацією або дегрануляцією клітин, що підтверджує відносну незалежність цих характеристик.

Імуногістохімічний аналіз макрофагального компонента виявив виражену просторову неоднорідність. CD68⁺-макрофаги переважали у стромі поблизу пухлинних комплексів і судин, CD163⁺-клітини частіше локалізувалися у глибоких стромальних, периваскулярних, фіброзних і некротичних ділянках РМЗ. Кількість CD68⁺-клітин при II стадії була у 1,9 раза вищою, ніж при I стадії, при Т2 – у 2,0 раза вищою порівняно з Т1, а при N⁺ – у 1,4 раза вищою, ніж при N0. У G3-карциномах кількість CD163⁺-макрофагів перевищувала показник високодиференційованих пухлин у 3,6 раза. Зниження співвідношення CD68⁺/CD163⁺ у новоутвореннях G3 і базальному підтипі РМЗ відображало відносне накопичення CD163⁺-субпопуляції, тоді як його підвищення при Т2, N⁺ і високому Ki-67 було пов'язане з переважним збільшенням загальної CD68⁺-популяції.

Сироваткові рівні IL-6 та IL-10 характеризувалися значною індивідуальною варіабельністю та не забезпечували самостійної стратифікації більшості досліджених клінічних груп РМЗ. Найбільш послідовною закономірністю було підвищення IL-6 у G3-пухлинах у 3,3 раза порівняно з G2. Водночас інтегрований аналіз показав тісний зв'язок рівня цитокінів із макрофагальною інфільтрацією РМЗ. За високих показників IL-6 у сироватці кількість CD68⁺- і CD163⁺-макрофагів була відповідно у 11,14

та 5,11 раза вищою, а за високого IL-10 кількість CD163⁺ -клітин зростала у 12,01 раза. Високі рівні мРНК *IL6* та *IL10* у тканині РМЗ асоціювалися зі збільшенням CD163⁺ -інфільтрації у 5,97 та 4,86 раза, а висока експресія *IL10* – також зі збільшенням CD68⁺ -клітин у 5,13 раза. Це обґрунтовує існування макрофагально-цитокінової мережі у мікрооточенні РМЗ.

Біоінформатичний аналіз засвідчив підвищення експресії *SPP1* і *SPARC* у тканині РМЗ порівняно з немалігнізованою тканиною молочної залози. У власній когорті експресія мРНК *SPP1* і *SPARC* зростала за наявності категорії Т2 відповідно у 1,7 та 1,6 раза, а при N⁺ – у 2,6 та 1,5 раза; найвиразніше підвищення обох генів спостерігали при базальному підтипі РМЗ. На білковому рівні OPN і ON не залежали від розміру первинної пухлини, але їх експресія була вищою у тканині РМЗ категорії N⁺, а також за низького ступеня диференціювання. Ядерна локалізація OPN частіше визначалася у N⁺ -пухлинах, низькодиференційованих новоутвореннях, при високому Ki-67 та відсутності експресії рецептора естрогену (ER) і PR.

Встановлено, що взаємозв'язок матрицелюлярних протеїнів із макрофагальним компонентом залежав від їх тканинної локалізації. Асоціацій між пухлинною експресією OPN або ON і кількістю CD68⁺ - та CD163⁺ -макрофагів не виявлено. Натомість за високої стромальної експресії OPN кількість CD163⁺ -макрофагів була у 2,17 раза більшою, кількість CD68⁺ -клітин, навпаки, у 2,06 раза меншою, а співвідношення CD68⁺ /CD163⁺ знижувалося. Це свідчить про відносне збагачення мікрооточення CD163⁺ -субпопуляцією.

Висока експресія OPN у пухлинних клітинах супроводжувалася збільшенням інтратуморальної кількості мастоцитів у 2,48 раза та зменшенням їх стромальної субпопуляції у 2,86 раза. Висока стромальна експресія OPN асоціювалася зі збільшенням загальної та стромальної кількості мастоцитів у 2,36 і 3,32 раза. За високої паренхіматозної експресії OPN активність дегрануляції підвищувалася на 54,38%, а за високої стромальної – на 101%. Отже, OPN пов'язаний не лише з кількістю та

топологією мастоцитів, а й з їх функціональною активністю. Для ON статистично значущого зв'язку з дослідженими макрофагальними показниками не встановлено, хоча його підвищення при N^+ , G3 і базальному підтипі свідчить про участь у формуванні агресивного стромального фенотипу.

Біоінформатичний аналіз показав, що miR-26a-5p, miR-155-5p і miR-18a-5p залучені до регуляції цитокінового сигналіngu, рекрутування мієлоїдних клітин, ангіогенезу та ремоделювання позаклітинного матриксу. Експресія miR-155-5p прямо корелювала із загальною макрофагальною інфільтрацією та M1-подібними макрофагами й обернено – з M2-подібними макрофагами і мастоцитами. Для miR-18a-5p також виявлено прямий зв'язок із M1-подібними та обернений – із M2-подібними макрофагами. У власній когорті пацієнтів підвищена експресія miR-26a-5p асоціювалася з N^+ , HER2/neu-позитивним статусом і Ki-67 > 14%, рівень miR-155-5p був нижчим у N^+ -пухлинах, а miR-18a-5p у протокових карциномах у 2,03 раза перевищувала відповідний показник у лобулярних карциномах.

Наукова новизна роботи полягає у комплексній ідентифікації взаємопов'язаних клітинних, цитокінових, матрицелюлярних і посттранскрипційних характеристик стромально-імунного мікрооточення, асоційованих зі ступенем злоякісності РМЗ. Показано незалежність змін кількості, топології, дегрануляції та зрілості мастоцитів; неоднорідність профілю CD68⁺ - і CD163⁺ -макрофагів; зв'язок системних і локальних рівнів IL-6 та IL-10 із макрофагальною інфільтрацією; топологічно залежні асоціації OPN із макрофагальним і мастоцитарним компонентами. Стромальна експресія OPN визначена як найбільш суттєва сполучна ланка між матрицелюлярною та імунною складовими мікрооточення.

Практичне значення одержаних результатів полягає в обґрунтуванні комплексної оцінки клітинного складу, просторової локалізації і функціонального стану мієлоїдних клітин, цитокінового профілю, експресії OPN/ON та регуляторних мікроРНК для поглибленої характеристики

агресивного фенотипу РМЗ. Результати щодо *SPP1/SPARC* і *OPN/ON* використано при підготовці методичних рекомендацій «Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу раку молочної залози».

Таким чином, ступінь злоякисності РМЗ визначається не окремим маркером, а поєднанням змін макрофагальної та мастоцитарної інфільтрації, цитокінового профілю, експресії матрицелюлярних протеїнів і регуляторних мікроРНК. Найбільш перспективним для подальшої валідації є інтегральний патерн, що включає *OPN*, *ON*, *IL-6*, *IL-10*, *miR-26a-5p*, *miR-155-5p*, *miR-18a-5p*, показники інфільтрації *CD68⁺* - і *CD163⁺* -макрофагами, а також кількісні, топологічні та функціональні характеристики мастоцитів.

Ключові слова: рак молочної залози, пухлинне мікрооточення, пухлинно-асоційовані макрофаги, *CD68*, *CD163*, мастоцити, дегрануляція, остеопонтин, остеонектин, *SPP1*, *SPARC*, *IL-6*, *IL-10*, агресивність пухлини.

SUMMARY

Pavlova A.O. The role of the macrophage and mast cell stromal–immune microenvironment in assessing breast cancer malignancy.

Qualifying scientific work submitted as a manuscript.

Dissertation submitted for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 09 “Biology”, specialty 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) is one of the most common malignancies worldwide and is characterized by substantial clinical and molecular heterogeneity. Despite advances in early detection, molecular classification, and systemic therapy, BC remains a leading cause of cancer-related mortality. Adverse outcomes are driven by tumor biological heterogeneity, metastatic progression, treatment resistance, and variability in clinical course, underscoring the need to identify new biomarkers and refine personalized treatment approaches.

Breast cancer progression is determined not only by the properties of malignant cells but also by the tumor microenvironment, which comprises tumor-associated macrophages, mast cells, fibroblasts, endothelial cells, extracellular matrix components, cytokines, growth factors, and regulatory non-coding RNAs. Interactions among these components coordinate angiogenesis, invasion, metastasis, immunosuppression, and therapeutic resistance. However, their integrated contribution to the development of an aggressive BC phenotype remains insufficiently understood.

Macrophages and mast cells are of particular interest because of their functional plasticity within the immune microenvironment. M2-like macrophages are associated with suppression of antitumor immunity, promotion of angiogenesis, and extracellular matrix remodeling. The biological role of mast cells is more

context-dependent and varies according to their localization within the tumor, functional state, and interactions with other microenvironmental components.

The matricellular proteins osteopontin (OPN) and osteonectin (ON), encoded by the *SPP1* and *SPARC* genes, are important modulators of cell–stroma interactions. They are involved in the regulation of adhesion, migration, proliferation, angiogenesis, epithelial–mesenchymal transition, and immune-cell function. The *SPP1*–macrophage axis is of particular interest as a potential mechanism contributing to the establishment of an immunosuppressive microenvironment. Microenvironmental function is also shaped by the balance between IL-6 and IL-10, which regulate inflammatory responses, tumor-cell proliferation, and macrophage activity. Accordingly, an integrated analysis of immune infiltration, matricellular factors, cytokine profiles, and regulatory microRNAs may help identify molecular and cellular features associated with BC aggressiveness. This dissertation focuses on identifying cellular and molecular patterns of the stromal–immune microenvironment associated with the degree of BC malignancy.

The study was conducted using clinical material from patients with stage I–II BC and employed morphological, histochemical, immunohistochemical, enzyme-linked immunosorbent assay, molecular-biological, bioinformatics, and statistical methods. The macrophage and mast-cell components of the tumor microenvironment were comprehensively evaluated, and the expression of matricellular proteins and their corresponding genes, IL-6 and IL-10 levels, and regulatory microRNAs were analyzed in relation to the main clinicopathological characteristics of BC.

Breast cancer tissue showed a twofold increase in total mast-cell (MC) density compared with fibroadenomas, while the number of intratumoral MCs was 5.9-fold higher. At the same time, the degranulation index in fibroadenomas was 34% higher than in BC, supporting the need to evaluate mast-cell abundance, localization, and functional state as distinct characteristics. T1 tumors exhibited greater intratumoral infiltration, whereas T2, N⁺, G3, and progesterone receptor

(PR)-negative tumors showed enhanced MC degranulation. Regional lymph-node metastasis was accompanied by increased stromal infiltration, while G3 tumors showed lower total and intratumoral MC numbers together with greater stromal representation. The maturity index did not correlate with cell number, localization, or degranulation, confirming the relative independence of these characteristics.

Immunohistochemical analysis of the macrophage compartment revealed pronounced spatial heterogeneity. CD68⁺ macrophages predominated in the stroma adjacent to tumor complexes and blood vessels, whereas CD163⁺ cells were more frequently localized in deeper stromal, perivascular, fibrotic, and necrotic areas of BC tissue. The number of CD68⁺ cells was 1.9-fold higher in stage II than in stage I tumors, 2.0-fold higher in T2 than in T1 tumors, and 1.4-fold higher in N⁺ than in N0 tumors. In G3 carcinomas, the number of CD163⁺ macrophages was 3.6-fold higher than in well-differentiated tumors. A lower CD68⁺/CD163⁺ ratio in G3 tumors and in the basal BC subtype reflected relative enrichment of the CD163⁺ subpopulation, whereas a higher ratio in T2, N⁺, and high-Ki-67 tumors was associated with a predominant increase in the overall CD68⁺ population.

Serum IL-6 and IL-10 levels showed substantial interindividual variability and, on their own, did not distinguish most of the clinicopathological BC groups examined. The most consistent finding was a 3.3-fold increase in IL-6 in G3 tumors compared with G2 tumors. Integrated analysis, however, demonstrated a close association between cytokine levels and macrophage infiltration in BC. At high serum IL-6 levels, CD68⁺ and CD163⁺ macrophage numbers were 11.14- and 5.11-fold higher, respectively, while high IL-10 levels were associated with a 12.01-fold increase in CD163⁺ cells. High IL6 and IL10 mRNA levels in BC tissue were associated with 5.97- and 4.86-fold increases in CD163⁺ infiltration, respectively, while high IL10 expression was also associated with a 5.13-fold increase in CD68⁺ cells. These findings support the existence of a macrophage–cytokine network within the BC microenvironment.

Bioinformatics analysis demonstrated increased SPP1 and SPARC expression in BC tissue compared with non-malignant breast tissue. In the study

cohort, *SPP1* and *SPARC* mRNA expression was 1.7- and 1.6-fold higher, respectively, in T2 tumors, and 2.6- and 1.5-fold higher, respectively, in N⁺ tumors; the most pronounced increase in both genes was observed in the basal BC subtype. At the protein level, OPN and ON expression was not associated with primary tumor size, but was higher in N⁺ BC tissue and in poorly differentiated tumors. Nuclear OPN localization was more frequently observed in N⁺ tumors, poorly differentiated neoplasms, tumors with high Ki-67, and tumors lacking estrogen receptor (ER) and PR expression.

The relationship between matricellular proteins and the macrophage compartment depended on their tissue localization. No associations were found between tumor-cell expression of OPN or ON and the numbers of CD68⁺ or CD163⁺ macrophages. In contrast, high stromal OPN expression was associated with a 2.17-fold higher number of CD163⁺ macrophages, a 2.06-fold lower number of CD68⁺ cells, and a reduced CD68⁺/CD163⁺ ratio, indicating relative enrichment of the microenvironment with the CD163⁺ subpopulation.

High OPN expression in tumor cells was accompanied by a 2.48-fold increase in intratumoral mast cells and a 2.86-fold decrease in the stromal mast-cell subpopulation. High stromal OPN expression was associated with 2.36- and 3.32-fold increases in total and stromal mast-cell numbers, respectively. High parenchymal OPN expression was associated with a 54.38% increase in degranulation activity, whereas high stromal expression was associated with a 101% increase. Thus, OPN was associated not only with mast-cell abundance and spatial distribution but also with their functional activity. No statistically significant relationship between ON and the macrophage parameters examined was identified, although increased ON expression in N⁺, G3, and basal-subtype tumors suggests its involvement in the formation of an aggressive stromal phenotype.

Bioinformatics analysis showed that miR-26a-5p, miR-155-5p, and miR-18a-5p are involved in the regulation of cytokine signaling, myeloid-cell recruitment, angiogenesis, and extracellular matrix remodeling. miR-155-5p expression correlated positively with overall macrophage infiltration and M1-like

macrophages, and negatively with M2-like macrophages and mast cells. miR-18a-5p likewise showed a positive association with M1-like macrophages and a negative association with M2-like macrophages. In the study cohort, increased miR-26a-5p expression was associated with N⁺ status, HER2/neu positivity, and Ki-67 > 14%; miR-155-5p expression was lower in N⁺ tumors, while miR-18a-5p expression in ductal carcinomas was 2.03-fold higher than in lobular carcinomas.

The scientific novelty of the study lies in the comprehensive identification of interconnected cellular, cytokine, matricellular, and post-transcriptional features of the stromal-immune microenvironment associated with the degree of BC malignancy. The study demonstrated the relative independence of changes in mast-cell number, topology, degranulation, and maturity; heterogeneity in the distribution of CD68⁺ and CD163⁺ macrophages; associations of systemic and local IL-6 and IL-10 levels with macrophage infiltration; and topology-dependent associations between OPN and the macrophage and mast-cell compartments. Stromal OPN expression emerged as the most prominent link between the matricellular and immune components of the microenvironment.

The practical significance of the findings lies in supporting an integrated assessment of myeloid-cell composition, spatial localization, and functional state, together with the cytokine profile, OPN/ON expression, and regulatory microRNAs, for a more detailed characterization of the aggressive BC phenotype. Findings related to *SPP1/SPARC* and OPN/ON were incorporated into the methodological recommendations entitled “Matricellular Proteins as Markers of Aggressive Breast Cancer”.

Overall, the degree of BC malignancy is determined not by a single marker, but by a combination of changes in macrophage and mast-cell infiltration, cytokine profiles, matricellular protein expression, and regulatory microRNAs. The most promising pattern for further validation is an integrated profile comprising OPN, ON, IL-6, IL-10, miR-26a-5p, miR-155-5p, miR-18a-5p, CD68⁺ and CD163⁺ macrophage infiltration parameters, and quantitative, topological, and functional characteristics of mast cells.

Keywords: breast cancer, tumor microenvironment, tumor-associated macrophages, CD68, CD163, mast cells, degranulation, osteopontin, osteonectin, *SPP1*, *SPARC*, IL-6, IL-10, tumor aggressiveness.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Chekhun V., Pavlova A., Zadvornyi T., Borikun T., Naleskina L., Mushii O., Bazas V., Lukianova N. Expression of SPP1 and SPARC genes in tumor tissue of patients with breast cancer. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 1. P. 13–21. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.01.013. (Особистий внесок здобувача: проведено формування та систематизацію бази клініко-патологічних даних, брала участь у проведенні молекулярно-біологічних досліджень експресії генів *SPP1* і *SPARC*, обробці та аналізі результатів, написанні та оформленні статті).
2. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Zadvornyi T., Lukianova N. Osteopontin-regulated changes in the mast cell population associated with breast cancer. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 3. P. 209–220. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.03.209. (Особистий внесок здобувача: взято участь у морфометричній оцінці мастоцитів та експресії остеопонтину у тканині РМЗ, інтерпретації результатів, оформленні та написанні статті)
3. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Borikun T., Lukianova N. Mast cells as a factor in regulation of breast cancer stromal component associated with breast cancer aggressiveness. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 4. P. 311–323. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.04.311. (Особистий внесок здобувача: взято участь у морфометричній оцінці мастоцитів, інтерпретації результатів, підготовці й оформленні статті)
4. Pavlova A., Mushii O., Bazas V., Karacharova I., Zadvornyi T., Lukianova N. Tumor-associated macrophages: relationship with clinical status of patients and molecular biological features of breast cancer. *Experimental Oncology*. 2025. Vol. 47, No. 2. P. 197–206. DOI: 10.15407/exp-oncology.2025.02.197. (Особистий внесок здобувача: проведення імуногістохімічного дослідження CD68⁺ - і CD163⁺ -макрофагів у тканині РМЗ, участь у обробці та аналізі результатів, написанні та оформленні статті)

5. Pavlova A., Mushii O., Zadvornyi T., Bazas V., Karacharova I., Lukianova N. Associations of tumor-associated macrophage infiltration with cytokine extracellular matrix signatures in breast cancer microenvironment. *Experimental Oncology*. 2025. Vol. 47, No. 4. P. 433–442. DOI: 10.15407/exp-oncology.2025.04.433. (Особистий внесок здобувача: проведено імуногістохімічне дослідження CD68⁺ - і CD163⁺ - макрофагів у тканині РМЗ та визначення рівнів цитокінів методом імуноферментного аналізу; взято участь в аналізі результатів, підготовці й оформленні статті.)
6. Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу раку молочної залози: методичні рекомендації / В. Ф. Чехун, Н. Ю. Лук'янова, І. М. Тодор, Л. А. Налєскіна, І. В. Шепеленко, Т. В. Борікун, Т. В. Задворний, В. М. Базась, Л. М. Кунська, А. О. Павлова, О. М. Мушій. Київ, 2023. 17 с.
7. Pavlova A., Borikun T., Lukianova Y., Zadvornyi T. Correlation between expression of OPN and ON in tumour tissue and circulating cytokines in patients with breast cancer. Abstracts of the International Scientific Conferences on Medicine & Public Health, Research Week 2023, Rīga Stradiņš University, 27–31 March 2023, Riga, Latvia. *Medicina (Kaunas)*. 2023. Vol. 59, Suppl. 2. P. 153.
8. Borikun T., Pavlova A., Zadvornyi T., Lukianova N. Evaluation of mRNA and protein profiles of IL-6 and IL-10 as blood biomarkers for breast cancer prognosis. Abstracts of the Conference “Assessment of Quality of Life in Cancer Patients Covered in Experimental and Clinical Oncology Publications: Challenges and Opportunities”, October 3–4, 2024, Kyiv, Ukraine. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 4. P. 410. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.04.410.
9. N. Lukianova, O. Mushii, T. Zadvornyi, A. Pavlova, T. Burda, V. Chekhun. Osteopontin-regulated changes in the mast cell population are associated with breast cancer: стендова доповідь. International Conference

- “Assessment of Quality of Life in Cancer Patients Covered in Experimental and Clinical Oncology Publications: Challenges and Opportunities”, October 3–4, 2024, Kyiv, Ukraine. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 4. P. 421. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.04.410.
10. Livandovska S., Borikun T., Pavlova A., Lukianova N. Prognostic value of interleukin-6 and interleukin-10 genes expression in patients with breast cancer. XXI International Conference “Shevchenkivska Vesna”. Kyiv, Ukraine, April 24–26, 2024. P. 191-192.
 11. Pavlova A., Mushii O., Zadvornyi T. Tumor-associated macrophages as a prognostic factor for the breast cancer course: стендова доповідь. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – Development Prospects in the 21st Century”, April 29–30, 2025. Kyiv, 2025. P. 86.
 12. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Zadvornyi T. Relationships of macrophage infiltration with the tumor extracellular composition and cytokine profile in breast cancer: стендова доповідь. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – Development Prospects in the 21st Century”, April 29–30, 2025. Kyiv, 2025. P. 85.
 13. Yeshchenko M., Voronin D., Pavlova A., Mushii O. Infiltration and functional activity of mast cells in the tissue of benign and malignant breast neoplasms: стендова доповідь. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – Development Prospects in the 21st Century”, April 29–30, 2025. Kyiv, 2025. P. 88.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	29
1.1 Рак молочної залози як актуальна медико-біологічна проблема	29
1.2 Стромально-імунне мікрооточення як детермінанта прогресування раку молочної залози	31
1.2.1 Мастоцити як функціонально пластичний компонент мікрооточення раку молочної залози	34
1.2.2 Пухлинно-асоційовані макрофаги у мікрооточенні раку молочної залози	37
1.3 Регуляторна мережа імунного мікрооточення раку молочної залози	40
1.3.1 Матрицелюлярні гени як модулятори клітинно-стромальних та імунних взаємодій при раку молочної залози	43
1.3.2 Роль цитокінів у регуляції стромально-імунного мікрооточення раку молочної залози	46
1.3.3 МікроРНК у посттранскрипційному контролі імунного мікрооточення раку молочної залози	49
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	55
2.1 Клініко-патологічна характеристика хворих на рак молочної залози	55
2.2 Біоінформатичний аналіз	57
2.3 Морфологічні та гістохімічні методи дослідження	60
2.4 Дослідження експресії молекулярних маркерів у тканині раку молочної залози за допомогою імуногістохімічного методу	63
2.5 Визначення рівнів цитокінів у сироватці крові хворих на рак молочної залози методом імуноферментного аналізу	65
2.6 Визначення експресії генів та мікроРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі	67
2.7 Методи статистичної обробки одержаних результатів	70

Розділ 3. ОСОБЛИВОСТІ ІНФІЛЬТРАЦІЇ ТА ФУНКЦІОНАЛЬ-	72
НИЙ СТАН МАСТОЦИТІВ У НОВОУТВОРЕННЯХ	
МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ	
3.1 Порівняльна характеристика мастоцитарної компоненти	72
доброякісних і злоякісних новоутворень молочної залози	
3.2 Зв'язок мастоцитарної інфільтрації та функціональної	73
активності з клініко-патологічними характеристиками раку	
молочної залози	
Розділ 4. ЗНАЧЕННЯ ПУХЛИНО-АСОЦІЙОВАНИХ МАКРО-	83
ФАГІВ У ФОРМУВАННІ СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ РАКУ	
МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ	
4.1 Морфофункціональна характеристика пухлино-асоційованих	83
макрофагів у тканині раку молочної залози	
4.2 Зв'язок макрофагального профілю раку молочної залози з	85
клініко-патологічними та молекулярно-біологічними	
характеристиками пухлинного процесу	
Розділ 5. ЦИТОКІНОВИЙ ПРОФІЛЬ ТА ЕПІГЕНЕТИЧНА	91
РЕГУЛЯЦІЯ ІМУННОГО МІКРООТОЧЕННЯ У ХВОРИХ НА	
РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ З РІЗНИМ КЛІНІЧНИМ	
СТАТУСОМ	
5.1 Експресія циркулюючих та пухлино-асоційованих IL-6 та	91
IL-10 у хворих на рак молочної залози	
5.2 Зв'язок цитокінового профілю зі ступенем макрофагальної	98
інфільтрації пухлинної тканини у хворих на рак молочної	
залози	
5.3 Вивчення <i>in silico</i> та <i>ex vivo</i> мікроРНК, залучених до	102
регуляції мікрооточення раку молочної залози	
Розділ 6. ЗНАЧЕННЯ МАТРИЦЕЛЮЛЯРНИХ ГЕНІВ У	125
РЕГУЛЯЦІЇ СТРОМАЛЬНО-ІМУННОГО МІКРООТОЧЕННЯ	
РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ	
6.1 Дослідження особливостей експресії <i>SPP1/SPARC</i> і <i>OPN/ON</i>	125
у тканині раку молочної залози в системі <i>in silico</i>	
6.2 Топологія та кількісні показники експресії	133
матрицелюлярних генів у хворих на рак молочної залози	
6.3 Зв'язок експресії матрицелюлярних протеїнів із клітинною	143
компонентою та цитокіновим профілем раку молочної	
залози	

Розділ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	152
ВИСНОВКИ	170
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	173
ДОДАТОК Б	190

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

PM3	–	рак молочної залози
ФА	–	фіброаденома молочної залози
TAM	–	пухлинно-асоційовані макрофаги
MC	–	мастоцити
ON	–	остеонектин (osteonectin)
OPN	–	остеопонтин (osteopontin)
SPARC	–	ген, що кодує остеонектин (secreted protein acidic and rich in cysteine)
SPP1	–	ген, що кодує остеопонтин (secreted phosphoprotein 1)
TME	–	пухлинне мікрооточення (tumor microenvironment)
IL-6	–	інтерлейкін-6
IL-10	–	інтерлейкін-10
PR	–	рецептор прогестерону (progesterone receptor)
ER	–	рецептор естрогену (estrogen receptor)
HER2/neu	–	рецептор епідермального фактора росту людини 2 (human epidermal growth factor receptor 2)
Ki-67	–	ядерний маркер проліферативної активності клітин
ІГХ	–	імуногістохімічний метод дослідження
ІФА	–	імуноферментний аналіз
ELISA	–	твердофазний імуноферментний аналіз (enzyme-linked immunosorbent assay)
ПЛІР	–	полімеразна ланцюгова реакція
OD	–	оптична щільність

ВСТУП

Актуальність теми.

Рак молочної залози (РМЗ) залишається однією з найактуальніших медико-біологічних проблем сучасності та найбільш поширеним злоякісним новоутворенням серед жінок у світі [1]. Незважаючи на суттєвий прогрес у ранній діагностиці, молекулярній класифікації та впровадженні сучасних методів системної терапії, РМЗ продовжує займати провідне місце у структурі смертності від злоякісних новоутворень [1, 5]. Основною причиною несприятливого прогнозу залишаються висока біологічна гетерогенність цієї форми раку, розвиток віддалених метастазів, формування резистентності до лікування та значна варіабельність клінічного перебігу захворювання [2–4]. У зв'язку з цим, одним із пріоритетних напрямів сучасної онкології є пошук нових молекулярних біомаркерів, здатних підвищити точність оцінки агресивності перебігу пухлинного процесу та вдосконалення стратегії персоналізованого лікування [6–9].

Протягом останнього десятиліття доведено, що ключову роль у прогресуванні РМЗ відіграють не лише властивості злоякісно трансформованих клітин, а й особливості пухлинного мікрооточення (ТМЕ), яке представляє складну систему взаємодії клітинних і неклітинних компонентів [11–18]. До складу клітинних компонентів відносять пухлинно-асоційовані макрофаги, мастоцити, фібробласти, ендотеліальні клітини, а неклітинних – складові позаклітинного матриксу, цитокіни, фактори росту та регуляторні некодуючі РНК [15, 16, 20–22, 65–71]. Власне ця архітектура міжклітинних комунікацій виступає ключовим тригером пухлинної прогресії, координуючи процеси ангіогенезу, інвазивного росту, метастазування, а також формування імуносупресивного мікрооточення та терапевтичної резистентності [14–20, 65–70]. Водночас більшість досліджень присвячена окремим компонентам ТМЕ, тоді як їх інтегральна роль у формуванні

агресивного фенотипу PM3 залишається недостатньо вивченою [17, 18, 65–71].

Особливий інтерес викликають пухлинно-асоційовані макрофаги (TAM) та мастоцити (MC) як одні з ключових ефекторних клітин імунного мікрооточення [38–44, 48–54]. Встановлено, що поляризація макрофагів у M2-подібний фенотип супроводжується пригніченням протипухлинної імунної відповіді, стимуляцією ангіогенезу, ремоделюванням позаклітинного матриксу та прогресуванням пухлинного процесу [48–56, 59, 60]. Водночас функціональна роль MC при PM3 залишається суперечливою, а існуючі відомості свідчать як про їх протипухлинні властивості, так і про здатність до стимулювання інвазії, ангіогенезу і формування імуносупресивного мікрооточення, що, вірогідно, пов'язано з їх функціональною гетерогенністю та особливостями взаємодії з іншими компонентами TME [38–44, 62, 63].

Потужними модуляторами взаємодії між трансформованими, стромальними та імунокомпетентними клітинами в пухлинному мікрооточенні є представники класу неструктурних протеїнів позаклітинного матриксу - остеопонтин (OPN) та остеонектин (ON), які кодуються генами *SPP1* та *SPARC* [72–75].

OPN та ON беруть участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, регуляції клітинної адгезії, міграції, проліферації, ангіогенезу та епітеліально-мезенхімального переходу [72–80, 85–93]. Крім того, вони модулюють рекрутування, диференціювання та функціональну активність клітин імунного мікрооточення, насамперед TAM [76, 81]. Особливий інтерес останніми роками привертає сигнальна вісь *SPP1*–пухлинно-асоційовані макрофаги, яка розглядається як один із механізмів формування імуносупресивного мікрооточення та прогресування пухлинного процесу [76, 79, 81].

Формування архітекtonіки пухлинного мікрооточення також суттєво залежить від балансу цитокінів IL-6 та IL-10: перший через свій прозапальний потенціал підтримує хронічне запалення та проліферацію

клітин пухлини, тоді як другий забезпечує протизапальну інверсію, пригнічуючи ефекторний імунітет та стимулюючи імуносупресивну активність M2-подібних макрофагів [94–101].

Інтегративний аналіз імунної інфільтрації, матрицелюлярних генів та цитокінового спектра у поєднанні з дослідженням епігенетичного ландшафту пухлини відкриває можливості для верифікації патогенетичних патернів, що детермінують агресивний фенотип PM3, і створює надійне наукове підґрунтя для розробки та валідації інноваційних підходів до персоналізованого лікування хворих [65–71, 102–110].

Мета. Ідентифікувати клітинні та молекулярні патерни стромально-імунного мікрооточення, асоційовані зі ступенем злоякисності раку молочної залози.

Завдання дослідження:

1. Вивчити рівень інфільтрації та функціональну активність мастоцитів у тканині PM3.
2. Дослідити особливості топології та кількісні показники інфільтрації тканини PM3 макрофагами.
3. Вивчити профіль циркулюючих та пухлинно-асоційованих цитокінів IL-6 та IL-10, а також регуляторних мікроРНК — miR-155-5p, miR-18a-5p, miR-26a-5p — у хворих на PM3 з урахуванням вмісту клітин імунної компоненти мікрооточення пухлини.
4. Дослідити зв'язок показників експресії матрицелюлярних генів на рівні мРНК (*SPP1* та *SPARC*) та білка (OPN та ON) з особливостями стромально-імунної компоненти мікрооточення PM3.
5. Ідентифікувати патерн молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів імунної компоненти мікрооточення для оцінки ступеня злоякисності PM3.

Об'єкт дослідження: рак молочної залози.

Предмет дослідження: стромально-імунне мікрооточення раку молочної залози (показники інфільтрації пухлинної тканини макрофагами та

мастоцитами, експресії матрицелюлярних генів на рівні білка та мРНК, експресії мікроРНК (miR-155-5p, miR-18a-5p, miR-26a-5p), цитокінів IL-6 та IL-10.

Методи дослідження.

Біоінформатичний аналіз проводили для комплексної оцінки експресії досліджуваних молекулярних маркерів, ідентифікації генів-мішеней регуляторних мікроРНК, визначення їх функціональних взаємозв'язків та вивчення асоціацій із клініко-патологічними характеристиками і показниками виживаності хворих на РМЗ із застосуванням сучасних біоінформатичних платформ та відкритих баз даних. Морфологічне дослідження пухлинної тканини проводили із використанням загальногістологічних методів. Рівень інфільтрації та функціональну активність МС визначали гістохімічним методом із використанням толуїдинового синього. Експресію ON, OPN, CD163 та CD68 у тканині раку молочної залози оцінювали імуногістохімічним методом. Рівні IL-6 та IL-10 у сироватці крові визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA). Експресію генів *SPP1*, *SPARC*, *IL-6* та *IL-10*, а також досліджуваних мікроРНК у пухлинній тканині визначали методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі (ПЛР). Статистичну обробку результатів проводили із застосуванням параметричних і непараметричних методів аналізу. Для оцінки достовірності відмінностей між двома незалежними групами використовували t-критерій Стюдента або U-критерій Манна–Уїтні відповідно до характеру розподілу даних. Для порівняння трьох і більше незалежних груп застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) або критерій Краскела–Уолліса з подальшим множинним порівнянням за критерієм Dunn. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Наукова новизна отриманих результатів.

На підставі комплексного морфологічного, молекулярно-біологічного та біоінформатичного дослідження вперше ідентифіковано характерні ознаки

комунікації клітинних, молекулярно-генетичних та епігенетичних компонентів стромально-імуного мікрооточення, асоційовані зі ступенем злоякисності РМЗ.

Доведено зв'язок топології та функціональної активності мастоцитів з такими показниками злоякисності РМЗ як категорія Т та N, ступінь диференціювання і молекулярний підтип новоутворень. Найбільшу кількість M2-поляризованих макрофагів зафіксовано у РМЗ високого ступеня злоякисності базального молекулярного підтипу.

Вперше виявлено та систематизовано кореляційні зв'язки між молекулярно-морфологічною таксономією МС і просторовою архітектонікою експресії OPN у стромально-паренхіматозній компоненті пухлини, що дозволило обґрунтувати їхню роль у детермінації ступеня злоякисності РМЗ. Висока експресія OPN у стромальному компартменті асоціюється зі збільшенням загального пулу МС у хворих із метастатичним ураженням регіонарних лімфовузлів, низьким ступенем диференціювання пухлини та її агресивними молекулярними підтипами, тоді як у паренхіматозному компартменті за наявності метастазів — прямо корелює виключно з інтенсивністю інтратуморальної інфільтрації тканинними базофілами РМЗ.

Обґрунтовано роль епігенетичних чинників у регуляції функціонального стану клітин мікрооточення РМЗ.

Розширено та доповнено наукові уявлення про паракринну та матрикс-опосередковану комунікацію у пухлинному мікрооточенні РМЗ за участю мастоцитів і макрофагів. Вперше охарактеризовано цілісну систему взаємодії цих клітинних популяцій на основі трирівневого профілювання, що включає оцінку циркулюючих цитокінів (IL-6 та IL-10), тканинну експресію матрицелюлярних генів на рівні мРНК і білка, та їх специфічні регуляторні мікроРНК – miR-155-5p, miR-18a-5p.

Практичне значення отриманих результатів результатів.

На підставі дослідження компонентів стромально-імуного мікрооточення РМЗ обґрунтовано доцільність комплексної оцінки показників

інфільтрації пухлинно-асоційованими макрофагами і МС, експресії матрицелюлярних генів на рівні мРНК та білка, цитокінів IL-6 та IL-10, а також регуляторних мікроРНК (miR-155-5p, miR-18a-5p) для поглибленої характеристики біології пухлинної клітини та оцінки ступеня злоякісності новоутворень.

Дослідження запропонованої панелі маркерів стромально-імунного мікрооточення дозволяє розширюють науково-практичні підходи до високоточного прогнозу клінічного перебігу РМЗ, стратифікації хворих за ризиком локорегіонарного та метастатичного прогресування з урахуванням ступеня злоякісності новоутворень, що забезпечує вчасну корекцію схем терапії, покращує віддалені результати лікування і показники виживаності цього контингенту хворих.

Для адресного інформування спеціалістів-онкологів та лікарів практичної ланки охорони здоров'я про шляхи та способи імплементації створених панелей біомаркерів видано методичні рекомендації «Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу раку молочної залози» (Медот. реком. / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, І.М. Тодор, Л.А. Налєскіна, І.В. Шепеленко, Т.В. Борікун, Т.В. Задворний, В.М. Базась, Л.М. Кунська, А.О. Павлова, О.М. Мушій //Київ, 2023. – 17 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. 84-85.

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

Отримані результати можуть бути використані під час подальших фундаментальних і прикладних досліджень, спрямованих на вивчення механізмів формування пухлинного мікрооточення, пошук нових молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів агресивності РМЗ, а також при розробці комплексних прогностичних моделей перебігу захворювання.

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

Дисертація виконувалась в рамках науково-дослідних робіт Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України за темами: «Розроблення та валідація технології комплексного лікування на рак молочної залози хворих молодого віку» (2022-2023, номер держреєстрації 0122U201203), та «Роль маркерів ремоделювання кісткової тканини у формуванні ступеня злоякісності найбільш розповсюджених гормонозалежних новоутворень» (2024-2028, номер держреєстрації 0118U005468).

Особистий внесок здобувача.

Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, виконаним безпосередньо авторкою. Спільно з науковим керівником сформульовано мету і завдання, розроблено дизайн та план дослідження, узагальнено отримані результати і сформульовано висновки дисертаційної роботи. Авторкою здійснено інформаційний пошук та аналіз сучасної наукової літератури за тематикою дослідження. Здобувачка брала безпосередню участь у виконанні експериментальної частини роботи, підборі та аналізі клінічного матеріалу, аналізі одержаних результатів і підготовці наукових публікацій до друку. Авторкою проведено статистичну обробку, аналіз та теоретичне узагальнення одержаних результатів.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на 4 міжнародних наукових і науково-практичних конференціях, а результати опубліковані у виданнях, що індексуються наукометричними базами Scopus чи Web of science.

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 наукових праць, зокрема 5 статей у наукових журналах, що індексуються міжнародними наукометричними базами Scopus та Web of Science, 1 методичні рекомендації та 7 тез доповідей міжнародних наукових конференцій.

Обсяг та структура дисертації.

Дисертацію викладено на 192 сторінках. Робота складається з анотації, списку наукових праць здобувача за темою дисертації, вступу, 7 розділів (зокрема огляду літератури, матеріалів і методів, 4 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів дослідження), висновків, списку використаних джерел та додатка. Список використаних джерел містить 133 найменування. Робота ілюстрована 15 таблицями та 58 рисунками.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Рак молочної залози як актуальна медико-біологічна проблема

Рак молочної залози залишається однією з провідних онкопатологій у світі та основною причиною смерті від злоякісних новоутворень серед жінок. За оцінками GLOBOCAN, у 2024 році було зареєстровано близько 2,43 млн нових випадків РМЗ і близько 694 тис. смертей, пов'язаних із цим захворюванням [1]. Незважаючи на значний прогрес у діагностиці та лікуванні, глобальний тягар РМЗ залишається високим, що визначає необхідність подальшого вдосконалення підходів до раннього виявлення, прогнозування перебігу та персоналізації терапії.

Основна частина летальних випадків при РМЗ пов'язана не з локалізованою первинною пухлиною, а з поширенням злоякісного процесу та формуванням віддалених метастазів [2]. Метастазування є складним багатоступеневим процесом, що передбачає набуття пухлинними клітинами інвазивних властивостей, їх інтравазацію у кровоносні та лімфатичні судини, виживання в системній циркуляції, екстравазацію у тканини віддалених органів із подальшою колонізацією та формуванням вторинних пухлинних вогнищ. Реалізація метастатичного каскаду визначається не лише внутрішніми молекулярно-генетичними властивостями трансформованих клітин, але й їх динамічною взаємодією з імунними та стромальними компонентами первинного пухлинного мікрооточення і метастатичних ніш [3].

РМЗ є надзвичайно гетерогенним захворюванням, для якого характерна як міжпухлинна, так і внутрішньопухлинна неоднорідність. Пухлини відрізняються за гістологічною будовою, ступенем диференціювання, експресією рецептора естрогену (ER) і рецептора прогестерону (PR), статусом рецептора епідермального фактора росту людини 2-го типу (HER2/neu), рівнем проліферативної активності,

молекулярним підтипом, а також якісним і кількісним складом клітинних компонентів мікрооточення. Така неоднорідність зумовлює значні відмінності у темпах росту, метастатичному потенціалі, чутливості до системної терапії та показниках виживаності. Навіть за подібних клініко-патологічних характеристик перебіг захворювання може суттєво відрізнятися, що свідчить про обмежену прогностичну інформативність ізольованого використання стандартних критеріїв [4].

Прогноз перебігу РМЗ значною мірою залежить від своєчасності й точності діагнозу, який має ґрунтуватися на комплексній оцінці соматичного стану хворої та біологічних характеристик пухлини. До загальновизнаних клініко-патологічних критеріїв належать розмір первинного новоутворення, статус регіонарних лімфатичних вузлів, клінічна стадія, ступінь гістологічного диференціювання, гістологічний тип, експресія рецепторів естрогену і прогестерону, HER2/neu -статус та рівень проліферативної активності за Ki-67 [5]. Водночас пошук додаткових маркерів, які самостійно або у комплексі з відомими показниками можуть точніше відображати механізми прогресування і біологічну агресивність РМЗ, залишається актуальним напрямом сучасної онкології.

Початок ХХІ століття ознаменувався усвідомленням необхідності переходу до персоналізованої медицини як одного з ключових чинників підвищення ефективності лікування хворих на рак [6, 7]. Такий підхід передбачає відмову від універсальних схем лікування та формування індивідуальних терапевтичних стратегій, заснованих на розумінні патофізіології і канцерогенезу, фармакогеноміки та індивідуальних молекулярних особливостей організму [8]. Для РМЗ персоналізований підхід має особливе значення через виражену молекулярну й клінічну гетерогенність.

Сучасне розуміння канцерогенезу вийшло за межі виключно генетичної моделі пухлинної трансформації. Рак розглядають як складне динамічне захворювання, перебіг якого визначається сукупністю генетичних,

молекулярних, клітинних, тканинних та системних факторів [9]. У концепції оновлених ознак раку особливого значення набувають запалення, фенотипова пластичність, взаємодія з мікробіомом, клітинне старіння та некодуючі механізми регуляції [10].

Якщо раніше основні дослідження були спрямовані переважно на пошук молекулярно-генетичних маркерів пухлинного росту, то нині значна увага приділяється TME [11]. Компоненти мікрооточення забезпечують біохімічний і біомеханічний сигналінг, впливають на проліферацію, міграцію, інвазію, ангіогенез, імунне ухилення та розвиток резистентності. Саме тому їх розглядають як важливі біологічні фактори прогресування та перспективні джерела прогностичних і предиктивних маркерів [12-14].

1.2. Стромально-іммунне мікрооточення як детермінанта прогресування раку молочної залози

TME являє собою складну багатокомпонентну систему, до якої входять злоякісно трансформовані клітини, клітини вродженого й адаптивного імунітету, пухлино-асоційовані фібробласти, ендотеліоцити, перицити, адипоцити та інші клітинні популяції. Неклітинний компонент представлений позаклітинним матриксом, розчинними цитокінами, хемокінами, факторами росту, протеазами, ліпідними медіаторами, позаклітинними везикулами та іншими регуляторними молекулами. Система взаємодій між пухлинними клітинами й елементами TME є визначальною для пухлинного росту та прогресії [15, 16] [14].

Поняття «стромально-іммунне мікрооточення» відображає функціональну взаємозалежність трансформованих клітин, стромальних елементів, імунних популяцій та продукованих ними регуляторних факторів. Сучасні дослідження клітинного складу і просторової організації тканини РМЗ засвідчили, що кількісне співвідношення, функціональний стан та локалізація пухлинних, стромальних й імунних клітин формують різні типи

ТМЕ, пов'язані з молекулярно-біологічними характеристиками новоутворень і клінічним перебігом захворювання [4, 17].

Стромальний компонент формує структурне та сигнальне середовище пухлини, тоді як імунний компонент значною мірою визначає баланс між протипухлинною імунною відповіддю та імуносупресією. Взаємодія між пухлинними клітинами й компонентами мікрооточення має двонаправлений характер: пухлинні клітини модифікують навколишнє середовище шляхом секреції цитокінів, факторів росту, матрицелюлярних білків і позаклітинних везикул, а стромальні та імунні клітини, своєю чергою, продукують медіатори, які впливають на проліферацію, виживання, фенотипову пластичність і міграційну активність трансформованих клітин [18, 19]. У міру прогресування РМЗ змінюються кількісний і якісний склад клітинної інфільтрації, секреторний профіль клітин, васкуляризація, метаболічні умови та функціональні властивості строми [20]. Сукупність цих змін формує самопідтримувальну систему міжклітинних взаємодій, яка сприяє пухлинному росту, інвазії, метастазуванню та розвитку резистентності до протипухлинної терапії [18].

Окремі компоненти ТМЕ, зокрема пухлино-інфільтруючі лімфоцити, ТАМ, МС та фібробласти, можуть модулювати ріст і міграцію трансформованих клітин та відігравати важливу роль у метастазуванні РМЗ [21, 22]. Імунні клітини здатні реалізовувати як протипухлинні, так і пропухлинні функції залежно від фенотипу, активаційного стану, просторової локалізації та складу медіаторів у мікрооточенні.

Однією з ключових властивостей ТМЕ є його просторова неоднорідність. Клітинні популяції, локалізовані в інтратуморальних ділянках, на інвазивному краї та у перитуморальній стромі, можуть відрізнятися за фенотипом і функціональною активністю. Тому біологічне та прогностичне значення має не лише абсолютна кількість певних клітин, але й співвідношення окремих популяцій, їх топографія, ступінь активації та характер просторової взаємодії з пухлинними комплексами [4, 17, 23].

Дослідження клітинного складу та просторової організації тканини РМЗ засвідчили, що пухлини одного молекулярного підтипу можуть суттєво відрізнятися за співвідношенням і локалізацією мієлоїдних, лімфоїдних та стромальних клітинних популяцій [4, 17].

Важливою характеристикою стромально-імунного мікрооточення є формування і підтримання хронічного запального стану. Тривала продукція прозапальних цитокінів і хемокінів здатна активувати сигнальні шляхи, що підтримують проліферацію, виживання та фенотипову пластичність пухлинних клітин. Зокрема, при РМЗ з HER2/неу-позитивним статусом активація IL-6-залежної запальної петлі сприяла розширенню популяції клітин зі стовбуровими властивостями та формуванню резистентності до трастузумабу [24]. В експериментальних моделях РМЗ вплив IL-6 також супроводжувався ознаками епітеліально-мезенхімального переходу, посиленням інвазивності пухлинних клітин і продукції VEGF ендотеліальними клітинами [25].

Паралельно з підтриманням запалення у ТМЕ формуються імуносупресивні механізми, які обмежують функціональну активність ефекторних лімфоцитів. Показано, що продукований пухлино-асоційованими макрофагами IL-10 пригнічує синтез IL-12 дендритними клітинами та послаблює CD8⁺ Т-клітинну відповідь на хіміотерапію [26]. Крім того, IL-17-продукуючі $\gamma\delta$ Т-клітини можуть сприяти накопиченню імуносупресивних нейтрофілів, які пригнічують активність CD8⁺ Т-лімфоцитів і підтримують метастазування РМЗ [27]. Нейтрофіли також здатні пригнічувати протипухлинну активність природних кілерів і полегшувати екстравазацію дисемінованих пухлинних клітин [28].

Функціональна активність ТМЕ визначає не лише темпи прогресування РМЗ, але й чутливість пухлини до медикаментозної терапії. Стромальні та імунні клітини здатні підтримувати залишкові пухлинні клони, модифікувати метаболічні умови, змінювати доступність лікарських засобів та пригнічувати протипухлинну імунну відповідь. Сучасні дані

свідчать, що резистентність до імунотерапії та системного лікування при РМЗ значною мірою залежить від взаємодії пухлинних клітин із макрофагами, фібробластами, регуляторними Т-клітинами та іншими компонентами мікрооточення [29].

Таким чином, формування агресивного фенотипу РМЗ є результатом складної взаємодії між молекулярними змінами у пухлинних клітинах та динамічною перебудовою їхнього мікрооточення. Клітинні й неклітинні компоненти ТМЕ беруть участь у регуляції проліферації, інвазії, метастазування, імунного ухилення та чутливості до протипухлинної терапії. У зв'язку з цим комплексна оцінка структури й функціонального стану пухлинного мікрооточення є перспективним підходом до поглиблення уявлень про механізми прогресування РМЗ та пошуку нових прогностичних і предиктивних біомаркерів.

1.2.1 Мастоцити як функціонально пластичний компонент мікрооточення раку молочної залози

Мастоцити МС, або тучні клітини, є тканинними імунними клітинами, залученими до регуляції запалення, ангіогенезу, репарації тканин, фіброзу та протипухлинної відповіді. У пухлинному мікрооточенні РМЗ вони залишаються одним із найменш вивчених компонентів, а їх клінічне значення досі є дискусійним [30, 31].

МС містять значну кількість попередньо синтезованих медіаторів у цитоплазматичних гранулах і здатні швидко вивільняти їх після активації. До складу їх секретому входять гістамін, триптаза, хімаза, протеоглікани, цитокіни, хемокіни, фактори росту та ліпідні медіатори. Функціональний стан МС визначається ступенем їх активації та характером секреції. У тканині можуть виявлятися інтактні, частково та інтенсивно дегранульовані клітини. За швидкої дегрануляції відбувається масивне вивільнення вмісту гранул, тоді як поступова дегрануляція характеризується вибірковою секрецією окремих компонентів без повного спустошення гранулярного

апарату. При цьому МС зберігають життєздатність і здатність до відновлення гранул [32, 33].

Ступінь зрілості МС є окремою характеристикою і не тотожний їх функціональній активності. Попередники цих клітин завершують диференціювання безпосередньо у тканинах під впливом локальних факторів мікрооточення, набуваючи певного складу секреторних гранул. У людини традиційно виділяють мастоцити типу МС $\square$, які містять переважно триптазу, та МС $\square_c$, гранули яких містять триптазу і хімазу. Ці фенотипи відображають насамперед тканинну спеціалізацію та протеазний склад клітин, а не послідовні незмінні етапи їх дозрівання [34, 35].

Залежно від функціонального стану та умов ТМЕ мастоцити можуть реалізовувати як пропухлинні, так і протипухлинні ефекти. Їх пропухлинна дія пов'язана із секрецією VEGF і FGF, які стимулюють ангіогенез, лімфангіогенез та активацію пухлино-асоційованих фібробластів. Триптаза і хімаза беруть участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, активації матриксних металопротеїназ і підвищенні проникності судин, створюючи умови для інвазії та метастазування пухлинних клітин [36, 37]. Гістамін посилює судинну проникність і може стимулювати проліферацію пухлинних клітин [38]. Водночас секреція IL-10 і TGF- β та взаємодія з регуляторними Т-клітинами й мієлоїдними супресорними клітинами можуть сприяти пригніченню активності Т-лімфоцитів і NK-клітин [39].

Протипухлинні властивості МС можуть реалізовуватися через продукцію TNF- α , цитокінів і хемокинів, які забезпечують рекрутування Т-лімфоцитів, NK-клітин і дендритних клітин до пухлинної тканини [39]. Окремі компоненти їх гранул, зокрема гепарин і хімаза, за певних умов можуть пригнічувати проліферацію пухлинних клітин та індукувати їх апоптоз [40, 41].

Подвійний характер функціональної активності МС відображається у суперечливих результатах клінічних досліджень. Висока щільність стромальних мастоцитів у тканині РМЗ асоціювалася зі сприятливим

перебігом захворювання та високими показниками виживаності хворих [42]. Натомість підвищений вміст триптази був пов'язаний із вищим ступенем злоякісності та метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів, а в експериментальних умовах триптаза посилювала міграцію й інвазію клітин РМЗ [43]. Отже, біологічне та прогностичне значення МС може залежати від їх просторової локалізації, ступеня зрілості й дегрануляції, а також спектра медіаторів, що вивільняються [44].

Регуляція функціональної активності МС є складним процесом. Імуноглобуліни та інтерлейкіни контролюють їх активацію, секрецію й дегрануляцію [45, 46]. У пухлинній тканині до класичних імунних стимулів додається вплив гіпоксії, факторів росту, метаболітів та компонентів стромы, що додатково визначає напрям функціональної відповіді МС.

Наявні дані вказують, що прогностичне значення мастоцитів залежить не лише від їх кількості, але і від функціонального стану. Визначення частки дегранульованих клітин може бути більш інформативним, ніж підрахунок загальної популяції, оскільки саме дегрануляція відображає інтенсивність вивільнення біологічно активних медіаторів. Комплексна оцінка загальної, інтратуморальної та дегранульованої популяцій МС надає можливість точніше охарактеризувати їх участь у формуванні агресивного фенотипу РМЗ

Таким чином, оцінка лише загальної кількості МС є недостатньою для повної характеристики їх біологічної ролі у тканині РМЗ. Інформативнішим є комплексний підхід, що передбачає визначення щільності клітин, їх просторової локалізації та ступеня дегрануляції, оскільки ці показники відображають не лише представленість мастоцитарного компонента, а й його функціональну активність. Зокрема, вивільнення триптази дегранульованими мастоцитами може бути залучене до ремоделювання пухлинної стромы та диференціювання міофібробластів, що обґрунтовує доцільність окремої оцінки дегрануляційного статусу МС [47].

1.2.2 Пухлинно-асоційовані макрофаги у мікрооточенні раку молочної залози

ТАМ є однією з найчисленніших популяцій імунних клітин у мікрооточенні солідних новоутворень різного гістогенезу [48]. Вони можуть походити з циркулюючих моноцитів, рекрутованих до пухлинної тканини, та з резидентних тканинних макрофагів. ТАМ беруть участь у механізмах вродженого й адаптивного імунітету, а їх фенотип і функціональна активність визначаються сукупністю локальних сигналів [49, 50] [51].

Традиційно макрофаги поділяють на два полярні функціональні типи — M1 і M2. M1-макрофаги характеризуються прозапальною активністю, презентацією антигенів, продукцією цитотоксичних медіаторів і участю у протипухлинній відповіді. M2-подібні макрофаги пов'язані з імуносупресією, ангіогенезом, репаративними процесами та підтриманням пухлинної прогресії [52, 53].

Водночас сучасні дослідження клітинної гетерогенності свідчать, що функціональні стани макрофагів формують безперервний спектр і не обмежуються двома стабільними фенотипами [54]. При РМЗ пухлинно-асоційовані макрофаги характеризуються значною молекулярною та функціональною гетерогенністю. Їхні властивості значною мірою визначаються локалізацією у певних ділянках тканини, взаємодією з трансформованими клітинами, судинами та іншими імунними популяціями [23]. Тому модель M1/M2 доцільно розглядати як спрощене функціональне узагальнення, яке не повністю відображає спектр фенотипових станів макрофагів у пухлинному мікрооточенні.

Функціональна пластичність є однією з ключових характеристик ТАМ. Після інфільтрації пухлинної тканини їхній фенотип і функціональна активність можуть змінюватися під впливом цитокінів, гіпоксії, метаболітів, факторів росту та інших сигналів мікрооточення. Така здатність до

фенотипового перепрограмування забезпечує адаптацію ТАМ до динамічних змін пухлинного мікрооточення та їх участь у прогресуванні РМЗ [51].

За результатами численних клінічних досліджень і метааналізів, високий рівень інфільтрації ТАМ, особливо CD163⁺ M2-подібними клітинами, при багатьох типах солідних пухлин асоціюється з агресивними клініко-патологічними характеристиками, підвищеним ризиком прогресування та низькими показниками виживаності хворих [55, 56, 57, 58]. У зв'язку з цим ТАМ розглядаються як перспективна терапевтична мішень, а стратегії впливу можуть бути спрямовані на блокування їх рекрутування, виснаження пропухлинних популяцій або функціональне перепрограмування [51].

Для оцінки загальної макрофагальної популяції у тканині РМЗ найчастіше використовують маркер CD68, тоді як CD163 розглядають як маркер переважно M2-подібного фенотипу. CD163 застосовують для ідентифікації M2-подібних ТАМ; зокрема, у дослідженні S. Tiainen та співавторів [59] за його експресією оцінювали щільність M2-подібних макрофагів у тканині РМЗ та встановили зв'язок їх високої кількості з несприятливим прогнозом.

CD68 є універсальним маркером макрофагів незалежно від їхнього функціонального стану. Завдяки цьому його застосовують в ІГХ дослідженні РМЗ для визначення щільності, локалізації та загального рівня макрофагальної інфільтрації. [60]. Водночас жоден із цих маркерів не відображає всього спектра функціональних станів ТАМ: CD68 не є специфічним маркером M1-макрофагів, а експресія CD163 не обмежується виключно стабільним M2-фенотипом. Тому одночасне визначення CD68⁺ і CD163⁺ клітин дозволяє провести комплексну оцінку загальної макрофагальної інфільтрації, представленість M2-подібної популяції, співвідношення маркерів та просторову локалізацію ТАМ у пухлинній тканині.

Попри значну кількість досліджень, універсальна прогностична роль TAM при РМЗ не з'ясована. Розбіжності можуть бути зумовлені різною локалізацією клітин у стромі та пухлинних комплексах, неоднаковими методами підрахунку, відмінностями між молекулярними підтипами й стадіями захворювання. Крім того, кількісна оцінка без урахування функціонального стану не завжди дозволяє визначити напрям біологічного впливу макрофагів.

Макрофаги та МС функціонують не ізольовано, а в межах спільної цитокіново-хемокінової мережі пухлинного мікрооточення. Мастоцитарні медіатори можуть впливати на рекрутування та функціональну активність макрофагів. Зокрема, в експериментальній моделі раку шлунка показано, що активовані мастоцити продукують CSF2, CCL3, CCL7 та IL-6, сприяючи накопиченню TAM, ангіогенезу та росту пухлини [61]. При РМЗ також встановлено взаємозв'язок між представленістю МС і макрофагів: їх кількість у тканині інвазивних карцином позитивно корелювала між собою, а накопичення цих клітин було пов'язане з ангіогенезом [62]. Водночас в іншому дослідженні виявлено обернений зв'язок між стромальними МС та CD68⁺ макрофагами, що свідчить про залежність їх співвідношення від просторової локалізації, функціонального стану клітин і біологічних властивостей пухлини [63].

Обидві клітинні популяції є джерелами цитокінів, хемокінів, факторів росту та протеаз, завдяки чому можуть одночасно впливати на запалення, ангіогенез, ремоделювання стромы та протипухлинну імунну відповідь. У тканині РМЗ рівень CCL2 був пов'язаний із накопиченням TAM і концентраціями VEGF, TNF- α та IL-8, що підтверджує функціональне поєднання механізмів рекрутування мієлоїдних клітин, запалення й ангіогенезу [64].

У контексті РМЗ особливе значення має співвідношення між прозапальними та імуносупресивними функціональними програмами цих клітин. Накопичення CD163⁺ M2-подібних TAM асоціюється з агресивними

характеристиками пухлини та несприятливим прогнозом, а продукований макрофагами IL-10 може пригнічувати CD8⁺ Т-клітинну відповідь на терапію [59, 26]. Пропухлинні секреторні програми мастоцитів, зокрема вивільнення триптази, також можуть посилювати міграцію та інвазію клітин РМЗ [43]. Водночас інші функціональні стани макрофагів і мастоцитів здатні підтримувати протипухлинну імунну відповідь. Це обґрунтовує необхідність одночасної оцінки кількості, локалізації та функціонального стану обох клітинних компонентів.

Отже, пухлино-асоційовані макрофаги та мастоцити є функціонально взаємопов'язаними компонентами стромально-імунного мікрооточення РМЗ. Їх біологічне та прогностичне значення доцільно оцінювати комплексно, з урахуванням цитокінового профілю, стану строми, просторової організації клітин і молекулярних механізмів регуляції ТМЕ.

1.3. Регуляторна мережа імунного мікрооточення раку молочної залози

Імунне мікрооточення раку молочної залози є динамічною багатокомпонентною системою, функціональний стан якої визначається не лише кількісним і якісним складом клітинного інфільтрату, а й характером міжклітинних та клітинно-матриксних взаємодій. Пухлинні, імунні, ендотеліальні та стромальні клітини формують складну мережу взаємних сигналів, яка постійно змінюється в процесі росту новоутворення. Водночас позаклітинний матрикс, розчинні медіатори, некодуючі РНК і позаклітинні везикули не лише забезпечують передавання сигналів, а й визначають їх просторову доступність, тривалість та біологічну спрямованість. Тому ТМЕ розглядають не як сукупність окремих компонентів, а як інтегровану регуляторну систему, що впливає на прогресування, метастазування, імунне ухилення та формування терапевтичної резистентності РМЗ [65, 66].

Характерною властивістю такої мережі є двоспрямованість комунікації. Пухлинні клітини змінюють склад і функціональну активність

навколишньої стромі, залучають імунні клітини та перепрограмовують їх відповідно до власних потреб. У відповідь клітини мікрооточення впливають на проліферацію, виживання, міграцію та інвазивність злоякісно трансформованих клітин. Унаслідок цього формуються замкнені контури позитивного і негативного зворотного зв'язку, які можуть підтримувати хронічне запалення, ангіогенез, ремоделювання позаклітинного матриксу або локальну імуносупресію. Напрямок таких змін залежить від стадії пухлинного процесу, молекулярного підтипу РМЗ, клітинного джерела сигналу та функціонального стану клітин-мішеней [67].

Важливе значення має просторова організація регуляторної мережі. Однаковий клітинний або молекулярний компонент може реалізовувати різні ефекти залежно від його розташування у паренхімі пухлини, стромі, периваскулярних ділянках або на інвазивному фронті. Просторове сусідство пухлинних та імунних клітин визначає можливість безпосереднього контакту, локальну концентрацію секретованих факторів і спрямованість імунної відповіді. Встановлено, що при РМЗ можуть формуватися відмінні просторові імунні мікроландшафти, які не завжди відображаються лише загальною кількістю інфільтруючих клітин, але мають самостійне клініко-біологічне значення [68].

Регуляція імунного мікрооточення здійснюється одночасно на кількох взаємопов'язаних рівнях. Позаклітинний рівень представлений розчинними медіаторами, які забезпечують швидке передавання сигналів між клітинами. Матрикс-опосередкований рівень визначає умови клітинної адгезії, міграції, доступність факторів росту та формування просторових ніш. На посттранскрипційному рівні відбувається контроль експресії генів, залучених до запальної відповіді, клітинної пластичності й імунної регуляції. Зазначені механізми не функціонують ізольовано: вони перехресжуються на рівні спільних внутрішньоклітинних сигнальних каскадів і взаємно посилюють або обмежують вплив один одного.

Водночас регуляторній мережі властиві функціональна надлишковість і контекст-залежність. Подібний біологічний ефект може забезпечуватися кількома медіаторами, а зміна активності одного з них частково компенсуватися іншими ланками. І навпаки, один фактор може впливати на різні клітинні популяції та спричиняти неоднакові, іноді протилежні наслідки. Саме тому поділ компонентів мікрооточення на виключно прозапальні або протизапальні, протипухлинні або пропухлинні не завжди відображає їх реальну біологічну роль. Їх дія визначається поєднанням локальних сигналів, рецепторним профілем клітин, тривалістю впливу і стадією розвитку пухлини. Подвійна роль клітин вродженого імунітету та медіаторів особливо виражена при РМЗ, де запальна відповідь може одночасно обмежувати пухлинний ріст і створювати умови для подальшої імуносупресії [69].

Ще однією особливістю регуляторної мережі є її здатність до самопідтримання. Сигнали, що виникають у відповідь на гіпоксію, ушкодження тканини або продукцію запальних медіаторів, можуть посилювати перебудову матриксу та змінювати секреторну активність клітин. Сформоване таким чином мікрооточення надалі підтримує функціональні стани імунних клітин, сприятливі для росту пухлини. У цьому контексті ремоделювання стромы є не лише наслідком пухлинної прогресії, а й активним чинником, який змінює механічні та біохімічні умови функціонування імунної компоненти [70].

Окремим способом передавання регуляторної інформації є позаклітинні везикули, за допомогою яких пухлинні та стромально-імунні клітини обмінюються білками, ліпідами й некодуючими РНК. Така форма комунікації забезпечує відносну стабільність молекулярного вмісту та можливість його перенесення як у межах пухлинного вогнища, так і до віддалених тканин. Завдяки цьому зміни посттранскрипційної регуляції в одній клітинній популяції можуть поширюватися на інші компоненти

мікрооточення і сприяти координованій перебудові їх функціонального стану [71].

Отже, формування імунного мікрооточення РМЗ є результатом не ізольованої дії окремих молекул, а взаємодії декількох рівнів регуляції. Цитокінові сигнали визначають спрямованість міжклітинної комунікації, матрицелюлярні компоненти формують просторовий і функціональний контекст її реалізації, а мікроРНК забезпечують специфічне посттранскрипційне налаштування відповідних генних програм. Дослідження цих складових як елементів єдиної мережі створює підґрунтя для розуміння механізмів формування ступеня злоякісності РМЗ.

1.3.1. Матрицелюлярні гени як модулятори клітинно-стромальних та імунних взаємодій при раку молочної залози

Матрицелюлярні протеїни належать до функціонально активної групи компонентів позаклітинного матриксу, які, на відміну від його структурних білків, не формують механічний каркас тканини, а регулюють міжклітинні та клітинно-матриксні взаємодії [72, 73]. Зв'язуючись із рецепторами клітинної поверхні, факторами росту, цитокінами та іншими компонентами матриксу, вони модулюють адгезію, міграцію, проліферацію, виживання клітин, ангіогенез і перебудову пухлинної строми. Порушення їх експресії може сприяти формуванню мікрооточення, що підтримує інвазивний і метастатичний потенціал трансформованих клітин [74].

Важливими представниками цієї групи є OPN, кодований геном *SPP1*, та ON, відомий також як secreted protein acidic and rich in cysteine — *SPARC*. Обидва протеїни є нефібрилярними глікопротеїнами, експресія яких змінюється за умов запалення, репарації тканин і пухлинної трансформації. Експериментальні та клінічні дані свідчать про їх участь у регуляції метастатичного потенціалу РМЗ [75].

OPN є секретованим фосфопропротеїном, який продукується пухлинними клітинами, макрофагами, фібробластами та іншими клітинами ТМЕ. Через

взаємодію з інтегриновими рецепторами та CD44 він регулює клітинну адгезію, міграцію, інвазію, виживання і міжклітинну комунікацію. Біологічні ефекти OPN залежать від його джерела його походження, локальної концентрації, протеолітичного процесингу та складу рецепторів на клітинах-мішенях [76, 77].

За фізіологічних умов і запальних процесах OPN бере участь у рекрутуванні імунних клітин, репарації тканин та загоєнні ран [78]. У пухлинному мікрооточенні ці механізми можуть набувати пропухлинного спрямування. Зокрема, продукований пухлинними клітинами OPN сприяє накопиченню макрофагів і разом з IL-4 посилює набуття ними M2-подібного функціонального стану. Водночас вплив OPN на злоякісно трансформовані клітини підтримує їх ріст, інвазію та метастатичний потенціал [79, 80].

Окремий функціональний стан макрофагів у складі TME представлений SPP1⁺ клітинами. За результатами транскриптомного аналізу на рівні окремих клітин тричі-негативного PM3 встановлено посилену взаємодію SPP1⁺ макрофагів із CD44⁺ пухлинними клітинами, пов'язану з формуванням хіміорезистентності. Це свідчить про участь сигнальної осі SPP1–CD44 у міжклітинній комунікації та є підґрунтям розглядати її як потенційну терапевтичну мішень [81].

Клінічне значення OPN при PM3 залишається неоднозначним. За результатами метааналізу, його підвищена експресія асоціювалася з низькими показниками виживаності хворих, інвазивністю та метастатичним потенціалом пухлин [82]. Водночас в окремих клінічних дослідженнях не було підтверджено його незалежне прогностичне значення, що може бути пов'язано з відмінностями у досліджуваних когортах хворих, методах його визначення та локалізації експресії [83].

ON/SPARC є секретованим матрицелюлярним глікопротеїном, який продукується фібробластами, макрофагами, ендотеліальними та пухлинними клітинами, особливо в ділянках запалення й активної перебудови тканини. Він має антиадгезивні властивості, взаємодіє з факторами росту та іншими

компонентами матриксу, завдяки чому модулює клітинні контакти, проліферацію, ангиогенез, міграцію та інвазію [84].

Функціональна роль ON при пухлинному процесі є контекст-залежною. З одного боку, у клітинах PM3 SPARC може сприяти активації MMP-2, а утворений унаслідок протеолітичного розщеплення катепсином D фрагмент ON стимулює міграцію, трансендотеліальне переміщення та інвазію клітин тричі-негативного PM3 [85, 86].

З іншого боку, індукована експресія ON у клітинах MDA-MB-231 пригнічувала їх проліферацію, тоді як високий рівень ендогенного ON знижував інвазивну активність і метастатичне поширення цих клітин [87, 88].

Різнострамованість ефектів ON може визначатися клітинним джерелом білка, його протеолітичним процесингом, просторовою локалізацією та локальними умовами TME. Зокрема, при тричі-негативному PM3 високий рівень ON у пухлино-асоційованих фібробластах визначено як незалежний несприятливий прогностичний фактор [89]. Водночас результати інших досліджень і метааналізів щодо зв'язку експресії ON із відповіддю на лікування, метастатичною активністю та виживаністю хворих залишаються суперечливими [90, 91, 92, 93].

Причинами розбіжностей у визначенні клінічного значення OPN і ON можуть бути використання різних методів оцінювання, неоднакових порогових значень, аналіз експресії на рівні мРНК або білка, дослідження загального тканинного матеріалу чи окремих клітинних компартментів, а також гетерогенність клінічних вибірок хворих. Особливо важливим є розмежування експресії у пухлинних і стромальних клітинах, оскільки функціональний вплив цих протеїнів значною мірою залежить від клітинного джерела та мікроанатомічної локалізації.

Отже, OPN і ON є функціонально активними компонентами TME, залученими до регуляції клітинно-стромальних взаємодій, імунних реакцій, інвазії та метастазування PM3. Їх біологічне і прогностичне значення доцільно оцінювати комплексно, з урахуванням рівня та локалізації експресії,

клітинного джерела, молекулярного підтипу пухлини й особливостей її мікрооточення.

1.3.2 Роль цитокінів у регуляції стромально-імуного мікрооточення раку молочної залози

Цитокіни є ключовими медіаторами міжклітинної комунікації у стромально-імуному мікрооточенні РМЗ. Вони забезпечують взаємодію між пухлинними, імунними та стромальними клітинами, регулюючи рекрутування й функціональний стан імунних популяцій, а також проліферацію, виживання, міграцію та інвазивність злоякісно трансформованих клітин. Біологічна дія цитокінів визначається їх концентрацією, клітинним джерелом, тривалістю секреції та сукупністю інших сигналів ТМЕ. Особливе значення при РМЗ мають IL-6 та IL-10, які відображають відповідно прозапальні та імуносупресивні напрями регуляції, хоча їх біологічна дія є контекст-залежною [94].

IL-6 є плейотропним прозапальним цитокіном, який продукується трансформованими клітинами, макрофагами, фібробластами, ендотеліоцитами та іншими компонентами ТМЕ. Його ефекти переважно реалізуються через рецепторний комплекс IL-6R/gp130 з подальшою активацією сигнального каскаду JAK/STAT3. Тривала активація STAT3 підтримує проліферацію і виживання пухлинних клітин, ангіогенез, клітинну пластичність та стійкість до апоптозу.

В експериментальних моделях РМЗ показано, що IL-6 сприяє епітеліально-мезенхімальному переходу та формуванню клітин зі стовбуроподібними властивостями. Активація осі IL-6–JAK1–STAT3–OCT4 забезпечувала перехід пухлинних клітин у стан, характерний для пухлинних стовбурових клітин, що може підтримувати внутрішньопухлинну гетерогенність та інвазивність [95, 96].

Аутокринна та паракринна продукція IL-6 формує позитивні зворотні зв'язки між пухлинними, імунними та стромальними клітинами. Значення

такого механізму продемонстровано при HER2/neu-позитивному РМЗ, де формування резистентності до трастузумабу супроводжувалося активацією ІЛ-6-залежного запального контуру та розширенням популяції пухлинних стовбурових клітин. Блокування рецептора ІЛ-6 зменшувало ріст новоутворень й метастазування в експериментальній моделі [24].

ІЛ-6 також бере участь у регуляції мієлоїдного компонента ТМЕ. Він може підтримувати накопичення імуносупресивних мієлоїдних клітин, посилювати інвазивні властивості пухлинних клітин і разом з іншими цитокінами модифікувати функціональний стан макрофагів [97, 98]. Отже, ІЛ-6 не слід розглядати лише як маркер класичного запалення, оскільки за певних умов він може підтримувати імуносупресивні стани ТМЕ.

Клінічне значення ІЛ-6 залежить від стадії захворювання та способу його визначення. У хворих на метастатичний РМЗ підвищений рівень циркулюючого ІЛ-6 був пов'язаний із поширеністю пухлинного процесу, наявністю вісцеральних метастазів та низькими показниками виживаності [99]. Водночас у хворих на ранні стадії РМЗ висока тканинна експресія ІЛ-6 в окремому дослідженні асоціювалася з кращими показниками виживаності, що свідчить про відмінності між системним рівнем цитокіну та його локальною експресією у пухлині [100].

ІЛ-10 є імунорегуляторним цитокіном, джерелами якого у ТМЕ можуть бути макрофаги, регуляторні Т-лімфоцити, мастоцити, дендритні, В- і пухлинні клітини. Він обмежує запальну відповідь, знижує продукцію прозапальних медіаторів, пригнічує функціональне дозрівання антигенпрезентувальних клітин і може послаблювати цитотоксичну Т-клітинну відповідь.

В експериментальній моделі РМЗ інфільтруючі макрофаги були основним джерелом ІЛ-10 у пухлинній тканині. Макрофагальний ІЛ-10 пригнічував експресію ІЛ-12 у внутрішньопухлинних дендритних клітинах, унаслідок чого обмежувалася CD8⁺ Т-клітинна відповідь на хіміотерапію. Блокування ІЛ-10R підвищувало ефективність лікування, але не змінювало

безпосередньо кількість або поляризацію макрофагів [26]. Тому IL-10 доцільно розглядати як медіатор імунорегуляторних станів TAM, а не як специфічний індуктор M2-поляризації.

Клінічні дані щодо прогностичного значення IL-10 при РМЗ є суперечливими. Високу тканинну експресію цитокіну пов'язували як із несприятливим прогнозом, особливо в гормонорецептор-негативних пухлинах, так і з кращою безрецидивною виживаністю хворих [101, 100]. Це підтверджує, що значення IL-10 залежить від його клітинного джерела, локалізації, рецепторного статусу та загального цитокінового контексту.

IL-6 та IL-10 функціонують у складі спільної медіаторної мережі разом із TNF- α , TGF- β , хемокінами та факторами росту. Переважання IL-6/STAT3-залежних сигналів може підтримувати хронічне запалення, клітинну пластичність і мієлоїдну імуносупресію, тоді як макрофагальний IL-10 здатний обмежувати антигенпрезентацію та цитотоксичну імунну відповідь. Тому співвідношення прозапальних та імунорегуляторних сигналів є більш інформативним, ніж ізольоване визначення одного цитокіну.

Важливим методологічним аспектом є розмежування локального і системного цитокінового статусу. Рівні IL-6 та IL-10 у сироватці відображають інтегральну реакцію організму, але не дозволяють встановити джерело їх продукції. Визначення мРНК у пухлинній тканині характеризує локальну транскрипційну активність, однак не завжди відповідає кількості секретованого білка. Тому поєднання оцінки циркулюючих цитокінів, їх локальної експресії та морфологічних характеристик імунної інфільтрації дає змогу повніше охарактеризувати функціональний стан TME.

Отже, IL-6 та IL-10 є взаємопов'язаними регуляторами запального й імуносупресивного компонентів мікрооточення РМЗ. Їх комплексна оцінка разом зі щільністю CD68⁺ і CD163⁺ макрофагів, функціональним станом МС та клініко-патологічними характеристиками пухлини може надати додаткову інформацію про механізми формування ступеня злоякісності РМЗ.

1.3.3 МікроРНК у посттранскрипційному контролі імунного мікрооточення раку молочної залози

Узагальнення сучасних даних свідчить, що мікроРНК є важливими посттранскрипційними регуляторами генних мереж, залучених до виникнення та прогресування злоякісних новоутворень. Зміни їх експресії можуть одночасно впливати на проліферацію, апоптоз, клітинну пластичність, інвазію, метастазування, ангіогенез, імунне ухилення та формування резистентності до протипухлинної терапії. Оскільки одна мікроРНК здатна контролювати численні гени-мішені, а окремі сигнальні шляхи регулюються сукупністю мікроРНК, порушення їх балансу може призводити до комплексної перебудови молекулярних програм пухлинних і стромально-імунних клітин. Це визначає доцільність вивчення мікроРНК для поглиблення уявлень про механізми злоякісної прогресії, а також для пошуку нових діагностичних, прогностичних і предиктивних біомаркерів.

hsa-miR-155-5p є одним із найбільш досліджених регуляторів запальної та протипухлинної імунної відповіді. Її функціональний ефект значною мірою залежить від клітинного джерела. У пухлинних клітинах PM3 miR-155 може проявляти онкогенні властивості: експериментально підтверджено безпосереднє пригнічення нею SOCS1, що сприяло проліферації та трансформації клітин [102]. В інших моделях підвищення miR-155 у трансформованих клітинах пов'язували з інвазивністю та хіміорезистентністю.

Водночас miR-155-5p відіграє важливу роль у підтриманні протипухлинної активності імунних клітин. У моделі PM3 підвищення її експресії у пухлинних клітинах посилювало інфільтрацію пухлинного вогнища Т-лімфоцитами та макрофагами з прозапальними властивостями, сповільнювало ріст новоутворень і підвищувало чутливість до блокади імунних контрольних точок. У зразках клінічного матеріалу високий рівень miR-155 також корелював зі сприятливим профілем протипухлинної імунної

відповіді [103]. Таким чином, miR-155-5p не можна однозначно класифікувати лише як онкогенну або пухлиносупресорну молекулу: її значення визначається тим, у яких клітинах вона експресується та які сигнальні мережі переважають у TME.

Експериментальні дані свідчать, що miR-26a-5p може регулювати запальні та мієлоїдні механізми на кількох рівнях. Один із них пов'язаний із контролем NF- κ B-залежної продукції цитокінів. Встановлено, що miR-26a не взаємодіє безпосередньо з мРНК IL6, але пригнічує індуковану TNF- α транскрипцію цього гена шляхом зниження експресії HMGA1 і MALT1 — регуляторів активації NF- κ B. Підвищення рівня miR-26a супроводжувалося послабленням експресії не лише IL6, а й ширшого спектра NF- κ B-залежних генів цитокінів, хемокінів і факторів ремоделювання тканин. Отже, вплив miR-26a-5p на IL-6 реалізується переважно опосередковано, через регуляцію прозапального сигнального каскаду, а не шляхом прямого зв'язування з мРНК цитокіну [104].

Окремий напрям дії miR-26a пов'язаний із регуляцією накопичення макрофагів у пухлинному мікрооточенні. У моделі гепатоцелюлярної карциноми підвищення її експресії знижувало продукцію макрофагального колонієстимулювального фактора M-CSF/CSF1 через PI3K/АКТ-залежний механізм і обмежувало рекрутування макрофагів до пухлинної тканини. Оскільки M-CSF є важливим фактором виживання, диференціювання та накопичення клітин моноцитарно-макрофагальної лінії, отримані результати свідчать, що miR-26a може впливати на кількісний склад мієлоїдного компонента TME опосередковано, через зміну секреторної активності пухлинних клітин [105].

Здатність miR-26a регулювати функціональну активність макрофагів підтверджена також у моделях із клітинно-специфічною зміною її експресії. У мишей із підвищеною експресією miR-26a у мієлоїдних клітинах спостерігали пригнічення запальної активності макрофагів Купфера та послаблення гепатоканцерогенезу, що вказує на можливість безпосередньої

регуляції нею внутрішньоклітинних прозапальних і проонкогенних програм макрофагів [106].

Водночас напрям впливу miR-26a-5p на функціональну поляризацію макрофагів є контекст-залежним. У моделі атеросклерозу показано, що miR-26a-5p у складі макрофагальних позаклітинних везикул безпосередньо зв'язувалася з 3'-нетрансльованою ділянкою мРНК PTGS2, пригнічувала сигнальний шлях NF-κB і сприяла переходу макрофагів від M1- до M2-подібного стану. Ці результати підтверджують здатність miR-26a-5p регулювати фенотип макрофагів через вісь PTGS2–NF-κB, але не можуть бути безпосередньо перенесені на пухлинне мікрооточення PM3 через відмінності між запальними та онкологічними моделями [107].

Безпосередній вплив miR-26a-5p на імунне мікрооточення PM3 залишається недостатньо вивченим. Проте встановлена в інших експериментальних моделях здатність цієї мікроРНК регулювати рекрутування макрофагів і PI3K/АКТ-залежні сигнальні механізми створює підґрунтя для дослідження її можливого зв'язку з макрофагальною інфільтрацією та цитокіновим профілем при PM3. У такому контексті визначення miR-26a-5p дозволяє оцінити не лише її потенційний вплив на біологічні властивості пухлинних клітин, але й можливу участь у перебудові стромально-імунного мікрооточення.

Вагомі підстави для включення до дослідження hsa-miR-18a-5p пов'язані з її безпосереднім зв'язком зі стромальним та імунним компонентами PM3. У тканині ER-негативних пухлин експресію miR-18a виявлено переважно в інтратуморальній стромі та на межі пухлини. Її локалізація частково збігалася з CD68⁺ клітинами, а в незалежних когортах рівень miR-18a позитивно корелював із представленістю макрофагів та активованих CD4⁺ Т-клітин пам'яті. Висока експресія також була пов'язана з відсутністю ER, високою проліферативною активністю та вираженою лімфоцитарною інфільтрацією [108].

Функціональний зв'язок miR-18a-5p із TAM підтверджено також у дослідженні міжклітинного перенесення мікроРНК. Малі позаклітинні везикули пухлинних клітин передавали miR-18a-5p макрофагам, де вона пригнічувала PIAS3, активувала STAT3 і підвищувала експресію PD-L1. Це сприяло формуванню M2-подібного імуносупресивного стану TAM та посиленню інвазії й метастазування PM3 [109]. Водночас при ER-позитивному PM3 високий рівень miR-18a пов'язували з активацією Wnt-сигналіngu, зниженням імунної інфільтрації та формуванням імунного ухилення [110]. Ці результати свідчать, що дія miR-18a-5p залежить від молекулярного підтипу PM3, клітинного джерела її походження та способу її передачі між клітинами.

Таким чином, обрані мікроРНК характеризують взаємодоповнюючі механізми прогресування PM3. miR-26a-5p пов'язана з контролем проліферації, гормонорецепторних сигналів і чутливості до терапії та потенційно може впливати на рекрутування мієлоїдних клітин; miR-155-5p є контекст-залежним регулятором цитокінового сигналіngu й протипухлинної активності імунних клітин; miR-18a-5p безпосередньо пов'язана зі стромальною локалізацією, макрофагальною інфільтрацією та формуванням імуносупресивного PD-L1⁺ фенотипу TAM. Це обґрунтовує дослідження їх експресії у взаємозв'язку з молекулярним підтипом, рецепторним статусом, проліферативною активністю пухлини, метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів, макрофагальною інфільтрацією та цитокіновим профілем хворих на PM3.

РЕЗЮМЕ

Рак молочної залози є біологічно гетерогенним захворюванням, перебіг якого визначається не лише властивостями пухлинних клітин, а й станом стромально-імунного мікрооточення. До його складу входять імунні та стромальні клітини, компоненти позаклітинного матриксу, цитокіни, позаклітинні везикули та регуляторні мікроРНК. Їх взаємодія впливає на проліферацію, інвазію, метастазування, ангіогенез, імунне ухилення та резистентність до лікування.

Важливими компонентами мікрооточення є МС та пухлинно-асоційовані макрофаги. Біологічна роль МС залежить від їх кількості, локалізації, зрілості та дегрануляції. Вони можуть підтримувати протипухлинну відповідь або сприяти ангіогенезу, ремоделюванню строми, інвазії та імуносупресії. TAM характеризуються функціональною пластичністю, а накопичення CD163⁺ M2-подібних клітин пов'язують з імуносупресією, ангіогенезом і несприятливим перебігом РМЗ. Їх оцінка має враховувати кількість, локалізацію та функціональний стан.

Матрицелюлярні протеїни OPN і ON, кодовані генами *SPP1* та *SPARC*, регулюють клітинно-матриксні й імунні взаємодії, адгезію, міграцію, інвазію, ангіогенез і перебудову позаклітинного матриксу. Їх ефекти залежать від клітинного джерела, локалізації та умов мікрооточення.

Цитокіни IL-6 та IL-10 формують взаємопов'язану регуляторну мережу. IL-6 підтримує хронічне запалення, клітинну пластичність і мієлоїдну імуносупресію, тоді як IL-10 обмежує ефекторну імунну відповідь та модулює стан макрофагів. Важливим є розмежування їх системного і локального рівнів.

МікроРНК забезпечують посттранскрипційний контроль генних програм пухлинних та імунних клітин. miR-26a-5p, miR-155-5p і miR-18a-5p залучені до регуляції цитокінового сигналінгу, рекрутування і поляризації макрофагів, імунного ухилення та терапевтичної резистентності. Комплексне

дослідження цих компонентів необхідне для розуміння механізмів формування агресивного фенотипу РМЗ та пошуку нових біомаркерів.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Клініко-патологічна характеристика хворих на рак молочної залози

Дослідження проведено на операційному матеріалі 134 хворих на РМЗ I–II стадій, які проходили лікування у Комунальному некомерційному підприємстві «Київський міський клінічний онкологічний центр» упродовж 2019–2022 рр. До дослідження також залучено операційний матеріал 30 пацієнток із фіброаденомою (ФА) молочної залози, який використовували як групу порівняння.

Проведення дослідження було схвалено Вченою радою та Комісією з питань біоетики Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Роботу виконували відповідно до положень Гельсінської декларації та принципів Належної клінічної практики. Усі пацієнтки надали письмову інформовану згоду на використання біологічного матеріалу для проведення наукового дослідження.

Обстеження хворих проводили із застосуванням загальноприйнятих клінічних і лабораторних методів відповідно до стандартів діагностики та лікування онкологічних хворих, затверджених наказом Міністерства охорони здоров'я України від 30.06.2015 № 396. Жодна з пацієнток до оперативного втручання не отримувала неoad'ювантного лікування. Стадію пухлинного процесу визначали відповідно до 8-го видання Міжнародної класифікації злоякісних пухлин TNM [111].

Середній вік хворих становив $58,36 \pm 1,66$ року, діапазон віку — від 28 до 89 років. Збережений менструальний цикл мали 42 (31,3%) пацієнтки, тоді як 92 (68,7%) перебували у менопаузі. РМЗ I стадії діагностовано у 44 (32,8%) хворих, II стадії — у 90 (67,2%). Пухлини категорії T1 виявлено у 54 (40,3%) пацієнток, T2 — у 80 (59,7%). Метастатичне ураження регіонарних лімфатичних вузлів було відсутнє у 88 (65,7%) випадках, тоді як категорію

N1 встановлено у 46 (34,3%) хворих. Основні клініко-патологічні характеристики досліджуваної групи наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Основні клініко-патологічні характеристики хворих на РМЗ

Показник	Кількість хворих, n	%
Загальна кількість хворих	134	100,0
Середній вік, роки	58,36 ± 1,66	—
Діапазон віку, роки	28–89	—
Репродуктивний статус		
Збережений менструальний цикл	42	31,3
Менопауза	92	68,7
Стадія захворювання		
I стадія	44	32,8
II стадія	90	67,2
Розмір первинної пухлини		
T1	54	40,3
T2	80	59,7
Статус регіонарних лімфатичних вузлів		
N0	88	65,7
N1	46	34,3
Гістологічний тип		
Інфільтративна протокова аденокарцинома	98	73,1
Інфільтративна лобулярна аденокарцинома	36	26,9
Ступінь диференціювання		
G1 — високий	6	4,5
G2 — помірний	112	83,6
G3 — низький	16	11,9
Молекулярний підтип		
Люмінальний А	60	44,8
Люмінальний В	40	29,9
Тричі-негативний	16	11,9
HER2/неу-позитивний	18	13,4

За гістологічною будовою у досліджуваній вибірці переважала інфільтративна протокова аденокарцинома, яку виявлено у 98 (73,1%) випадках; інфільтративну лобулярну аденокарциному діагностовано у 36 (26,9%) хворих. Більшість пухлин характеризувалися помірним ступенем диференціювання: G2 встановлено у 112 (83,6%) випадках. Високодиференційовані пухлини G1 виявлено у 6 (4,5%), низькодиференційовані G3 — у 16 (11,9%) пацієнток.

За молекулярним підтипом переважали люмінальні пухлини: люмінальний А підтип визначено у 60 (44,8%) випадках, люмінальний В — у 40 (29,9%). Тричі-негативний РМЗ виявлено у 16 (11,9%) хворих, HER2/neu-позитивний — у 18 (13,4%).

Позитивний статус PR встановлено у 102 (76,1%) пухлинах, ER — у 92 (68,7%), HER2/neu — у 44 (32,8%) випадках. Високу проліферативну активність, яку оцінювали за рівнем Ki-67 понад 14% позитивних клітин, виявлено у 112 (83,6%) пухлинах. Рецепторний статус і проліферативну активність пухлин РМЗ представлено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Рецепторний статус і проліферативна активність РМЗ

Показник	Позитивний статус, n (%)	Негативний статус, n (%)
ER	102 (76,1)	32 (23,9)
PR	92 (68,7)	42 (31,3)
HER2/neu	44 (32,8)	90 (67,2)
Ki-67	>14%: 112 (83,6)	<14%: 22 (16,4)

2.2. Біоінформатичний аналіз

Біоінформатичний аналіз проводили з метою оцінки особливостей експресії матрицелюлярних генів *SPP1* і *SPARC*, що кодують відповідно OPN та ON, визначення їх тканинної специфічності, зв'язку з клініко-

патологічними характеристиками РМЗ і показниками виживаності хворих. Окремо досліджували регуляторний потенціал кандидатних мікроРНК hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-155-5p та hsa-miR-18a-5p, їхні гени-мішені, зв'язок з імунною інфільтрацією та особливості експресії у тканині РМЗ.

Експресію OPN і ON у нормальних та пухлинних тканинах на рівні білка, а також панканцерний профіль експресії мРНК *SPP1* і *SPARC* аналізували за допомогою ресурсу The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). Використовували дані розділів Tissue Atlas і Pathology Atlas, що містять результати транскриптомного та імуногістохімічного профілювання тканин. Рівень експресії мРНК оцінювали за показниками рTPM, а білкову експресію — за частотою та інтенсивністю імуногістохімічного забарвлення із застосуванням валідованих антитіл.

Порівняння експресії *SPP1* і *SPARC* у пухлинній та немалігнізованій тканині молочної залози, а також аналіз залежно від клінічної стадії і стадійної підгрупи РМЗ проводили на платформі GEPIA3 — Gene Expression Profiling Interactive Analysis 3 (<https://gepia.cancer-pku.cn/>). Платформа інтегрує транскриптомні дані The Cancer Genome Atlas — TCGA (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) для пухлинних зразків і Genotype-Tissue Expression — GTEx (<https://gtexportal.org/home/>) для нормальних тканин. Рівні експресії представляли у шкалі TPM та після логарифмічного перетворення $\log_2$ (TPM+1).

Клінічні й транскриптомні дані когорти TCGA-BRCA використовували для оцінки прогностичного значення *SPP1* і *SPARC*. Загальну виживаність аналізували після розподілу пацієнтів на групи з високим і низьким рівнями експресії відповідного гена. Результати оцінювали за кривими Каплана—Маєра, медіаною загальної виживаності, відношенням ризиків, 95 % довірчим інтервалом і значенням *p*.

Для визначення потенційних генів-мішеней hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-155-5p та hsa-miR-18a-5p використовували платформу miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca/>). Мережі взаємодій «мікроРНК—ген-мішень»

формували на основі експериментально підтверджених даних бази DIANA-TarBase (<https://microrna.gr/tarbase/>). Аналіз був спрямований на виявлення генів, залучених до регуляції імунної відповіді, міжклітинної комунікації, проліферації, апоптозу, ангіогенезу та ремоделювання позаклітинного матриксу.

Ступінь перекриття переліків генів-мішеней досліджуваних мікроРНК оцінювали за допомогою вебресурсу InteractiVenn (<https://www.interactivenn.net/>). За діаграмами Венна визначали унікальні гени-мішені кожної мікроРНК, спільні мішені окремих пар і гени, одночасно асоційовані з усіма трьома мікроРНК.

Зв'язок експресії мікроРНК зі ступенем інфільтрації пухлинного мікрооточення імунними клітинами аналізували за допомогою ресурсу ImmReg (<https://bio-bigdata.hrbmu.edu.cn/ImmReg/index.jsp>). Оцінювали асоціації з макрофагами, M1- і M2-макрофагами, мастоцитами, моноцитами, нейтрофілами, Т- і В-лімфоцитами. Для деконволюції клітинного складу використовували інтегровані у платформу алгоритми xCell, CIBERSORT, CIBERSORT-ABS, quanTIseq, TIMER і MCP-counter. Силу та напрям взаємозв'язків визначали за коефіцієнтом кореляції, наведеним у базі.

Особливості експресії мікроРНК у тканині РМЗ аналізували на платформі UALCAN, у розділі TCGA miRNA (<https://ualcan.path.uab.edu/analysis-mir.html>), з використанням даних TCGA-BRCA. Рівні експресії порівнювали між первинними пухлинами та умовно нормальною тканиною молочної залози, а також залежно від клінічної стадії, стану регіонарних лімфатичних вузлів, молекулярного підтипу й гістологічного типу пухлини. Експресію представляли у RPM — reads per million. Оскільки в UALCAN не були доступні окремі профілі зрілих форм hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-155-5p та hsa-miR-18a-5p, аналізували відповідні попередники hsa-mir-26a-1, hsa-mir-155 та hsa-mir-18a.

Статистичні показники використовували відповідно до алгоритмів кожного вебресурсу. Відмінності та кореляційні зв'язки вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

2.3. Морфологічні та гістохімічні методи дослідження

Операційний матеріал фіксували протягом 24 год при кімнатній температурі у 10% розчині нейтрального забуференого формаліну. Після завершення фіксації матеріал піддавали стандартній гістологічній проводці із поступовим зневодненням у розчинах етилового спирту висхідної концентрації (50%, 70% та 80%) і двох змінах 96% етанолу, який використовували замість абсолютного спирту. Після цього здійснювали целоїдин-парафінову проводку з подальшою заливкою матеріалу в парафінові блоки з додаванням 5% натурального воску.

З парафінових блоків за допомогою ротаційного мікротома AMR 400 (Amos Scientific, Австралія) виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5–7 мкм. Перед проведенням гістологічного та імуногістохімічного дослідження зрізи депарафінізували у двох змінах ксилолу протягом 20 хв, після чого здійснювали їх регідратацію у 96% етиловому спирті.

Фарбування тулоїдиновим синім

Для ідентифікації МС та оцінки ступеня їх дегрануляції застосовували метод метахроматичного забарвлення гранул толуїдиновим синім, фарбування проводили з використанням барвника Toluidine blue polychrome (Diapath, Milano, Italy).

На гістологічні зрізи наносили 1 мл барвника та інкубували протягом 20 хв. Після цього надлишок барвника змивали дистильованою водою, а зрізи диференціювали у 96% етиловому спирті до появи світло-блакитного забарвлення тканини при мікроскопічному контролі. Надалі препарати просвітлювали у ксилолі та заключали в синтетичне середовище Cytoseal 60 (Thermo Scientific, США).

Мікроскопічне дослідження препаратів здійснювали з використанням світлового мікроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). У результаті метакроматичного забарвлення гранули мастоцитів набували фіолетового кольору, тоді як ядра та базофільні структури цитоплазми клітин забарвлювалися ортокроматично у світло-синій колір.

Інтрамуральною локалізацією мастоцитів вважали їх розташування у паренхіматозному компоненті РМЗ або на межі стромального та паренхіматозного компонентів пухлинної тканини. Стромальну локалізацію визначали у випадках розташування МС у стромальному компоненті РМЗ за відсутності їх візуального контакту з пухлинними клітинами.

Кількість МС оцінювали у 20 полях зору за збільшення $\times 200$ та представляли у вигляді $M \pm m$ на одиницю площі — 1 мм^2 , де M – середнє арифметичне, m – стандартна помилка середнього. Ступінь дегрануляції МС визначали при збільшенні $\times 1000$. Індекс дегрануляції МС розраховували за формулою Лінднера [112]:

$$ID = (A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3) / n,$$

де A — неактивні МС (гранули щільно розташовані в цитоплазмі, ядро не візуалізується), B — слабо дегранульовані МС (ядро добре візуалізується, гранули розташовуються всередині клітини та не виходять за межі цитоплазматичної мембрани), C - помірно дегранульовані МС (гранули частково виходять за межі неушкодженої цитоплазми), D - сильно дегранульовані МС (повністю дегранульовані МС з розірваною цитоплазматичною мембраною), n - сумарна кількість проаналізованих клітин. Отримані значення індексу дегрануляції представляли в умовних одиницях (у.о.).

Фарбування альціановим синім і сафраніном О

Для оцінки ступеня зрілості МС застосовували метод комплексного гістохімічного фарбування 1 % альціановим синім і 0,5 % сафраніном О [113].

Робочий 1 % розчин альціанового синього готували шляхом змішування 1 % водного розчину барвника з 5 % оцтовою кислотою у співвідношенні 1:10. Для приготування 1 % водного розчину альціанового синього 1 г барвника розчиняли у 100 мл теплої дистильованої води, після чого додавали 2 мл льодяної оцтової кислоти, фільтрували та вносили 0,1 мг тимолу. Розчин сафраніну О концентрацією 0,5 % готували шляхом розчинення 0,5 г барвника у 100 мл теплої дистильованої води з подальшим фільтруванням. У зв'язку зі світлочутливістю сафраніну О приготовлений розчин зберігали у флаконі з темного скла.

Оскільки альціановий синій ефективніше виявляє МС за низьких значень рН [113], до складу робочого розчину додавали льодяну оцтову кислоту. Для забезпечення належного забарвлення незрілих МС гістологічні зрізи занурювали у 1 % робочий розчин альціанового синього та інкубували у термостаті за температури 37 °С упродовж 24 год. Після завершення інкубації на зрізи наносили 0,5 % розчин сафраніну О, додавали краплю льодяної оцтової кислоти та витримували препарати протягом 3–4 хв. Після цього зрізи швидко промивали проточною водою та висушували на повітрі до повного висихання.

Для просвітлення тканинних зрізів препарати витримували у ксилолі, після чого заключали у синтетичне середовище Cytoseal 60 (Thermo Scientific, США). Мікроскопічне дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Оберкохен, Німеччина).

За результатами фарбування гранули незрілих МС набували блакитного забарвлення внаслідок зв'язування альціанового синього, тоді як гранули зрілих МС забарвлювалися сафраніном О у рожевий колір. У процесі дозрівання мастоцитів спостерігали поступову зміну характеру забарвлення.

Клітини проміжного ступеня зрілості могли містити рожеві гранули із синім обідком або мати фіолетове забарвлення цитоплазми, зумовлене поєднанням синіх і рожевих гранул [113].

Ступінь зрілості МС оцінювали при збільшенні $\times 1000$. Індекс зрілості мастоцитів (Mast Cell Maturity Index, МСМІ) розраховували за формулою:

$$\text{МСМІ} = \frac{100 \times \text{незрілі МС} + 200 \times \text{проміжні МС} + 300 \times \text{зрілі МС}}{\text{усі МС}}$$

де N — кількість мастоцитів відповідної категорії зрілості.

Отримані значення індексу зрілості мастоцитів виражали в умовних одиницях.

2.4. Дослідження експресії молекулярних маркерів у тканині раку молочної залози за допомогою імуногістохімічного методу

Для дослідження експресії молекулярних маркерів використовували гістологічні зрізи товщиною 5 мкм, виготовлені з парафінових блоків операційного матеріалу. Перед постановкою ІГХ реакції зрізи депарафінізували в ортоксилолі та 96% етиловому спирті з подальшою регідратацією у дистильованій воді. Демаскування антигенів проводили у цитратному буфері (рН 6,0) на водяній бані WB-4MS (Biosan, Латвія) протягом 20 хв.

ІГХ дослідження виконували із застосуванням системи візуалізації UltraVision LP Detection System (Thermo Scientific, США). Реакцію проводили відповідно до рекомендацій виробника та включали блокування ендогенної пероксидазної активності, неспецифічного зв'язування білків, інкубацію з первинними моноклональними антитілами, нанесення вторинних антитіл, полімерної системи візуалізації та хромогену 3,3'-діамінобензидину. Ядра клітин дофарбовували гематоксиліном Майєра (Thermo Scientific Richard-

Allan, USA. Перелік використаних моноклональних антитіл, їх клонів, робочих розведень та виробників наведено в табл. 2.3.

Для контролю специфічності ІГХ реакції одночасно з дослідними зразками проводили негативний контроль. Як негативний контроль використовували зрізи, на які замість первинних антитіл наносили буферний розчин.

Таблиця 2.3

Моноклональні антитіла, які були використані для дослідження експресії молекулярних маркерів у тканині РМЗ

Молекулярний маркер	Клон	Розведення	Фірма - виробник
SPP1	ON1-1	1:300	Thermo Scientific, USA
SPARC	7C5H12	RTU	Master Diagnostic, Spain
CD68	KP-1	RTU	Master Diagnostica, Spain
CD163	OTI2G12	1:150	Abcam, USA

Оцінку результатів ІГХ дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопа Primo Star (Carl Zeiss, Німеччина). Рівень експресії досліджених маркерів визначали напівкількісним методом H-Score та розраховували за формулою:

$$S = 0 \times N_0 (\%) + 1 \times N_1 (\%) + 2 \times N_2 (\%) + 3 \times N_3 (\%),$$

де S — показник H-Score; N_0 — відсоток клітин без експресії; N_1 , N_2 та N_3 — відсоток клітин із низьким, помірним та високим рівнем експресії відповідно.

Отримані значення інтерпретували таким чином: 1–100 балів — низький, 101–200 балів — помірний, 201–300 балів — високий рівень експресії [115, 116].

Для кількісної оцінки макрофагальної інфільтрації пухлинної тканини визначали кількість CD68⁺ -клітин, що відображали загальну популяцію макрофагів, та CD163⁺ -клітин, які розглядали як макрофаги M2-фенотипу. Підрахунок імунопозитивних клітин проводили окремо в інтратуморальних і перитуморальних ділянках у п'яти полях зору з найбільшою щільністю клітинної інфільтрації. Отримані результати виражали як середню кількість позитивно забарвлених клітин на 1 мм² тканини.

Для кількісної оцінки оптичної густини експресії (OD) у стромі новоутворень молочної залози для кожного зразка отримували 10 мікрофотографій при збільшенні $\times 400$. Аналіз мікрофото проводили із використанням пакету програмного забезпечення ImageJ (LOCI, University of Wisconsin, USA) та плагіну IHC profiler [116]. Кількісно стромальну експресію розраховували із використанням формули optical density score:

$$\text{ODS} = P0 \times 1 + P1 \times 2 + P2 \times 3 + P3 \times 4,$$

де ODS – optical density score; P0 – кількість пікселів з відсутньою експресією; P1, P2 та P3 – з низькою, середньою та високою експресією, відповідно. Значення optical density score варіювалося від 1 до 4 у.о..

2.5. Визначення рівнів цитокінів у сироватці крові хворих на рак молочної залози методом імуноферментного аналізу

Для кількісного визначення рівнів IL-6 та IL-10 у сироватці крові хворих на РМЗ застосовували метод твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА). Дослідження проводили із використанням комерційних наборів Human IL-6 ELISA Kit та Human IL-10 ELISA Kit (Elabscience, США) відповідно до інструкції виробника.

Сироватку крові отримували шляхом центрифугування зразків протягом 20 хв при 1500 об/хв. До проведення дослідження зразки зберігали при температурі $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, не допускаючи повторного циклу заморожування–розморожування.

У лунки мікропланшета вносили стандарти та досліджувані зразки по 100 мкл і інкубували протягом 90 хв при температурі 37 °С. Після цього послідовно додавали біотинільовані антитіла, специфічні до відповідного інтерлейкіну людини, та кон'югат авідину з пероксидазою хрому, інкубуючи реагенти відповідно до інструкції виробника. Після кожного етапу інкубації незв'язані компоненти видаляли шляхом промивання лунок.

Для візуалізації імунних комплексів до кожної лунки додавали 90 мкл хромогенного субстрату та інкубували протягом 15 хв при 37 °С. За наявності комплексу «антиген–антитіло» розчин набував блакитного забарвлення. Реакцію зупиняли додаванням 50 мкл стоп-розчину, після чого забарвлення змінювалося на жовте. Оптичну густину вимірювали на мікропланшетному рідері Synergy™ HT (BioTek, США) при довжині хвилі 450 нм. Концентрацію IL-6 та IL-10 визначали за калібрувальними кривими, побудованими на основі стандартних розчинів відповідно до рекомендацій виробника. Дані калібрування стандартних кривих наведено в таблиці 2.4 – 2.5, а відповідні калібрувальні криві — на рисунку 2.1.

Таблиця 2.4

**Значення оптичної густини стандартів IL-6 для побудови
калібрувальної кривої**

Концентрація (пг/мл)	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	0
Оптична густина	2,475	1,624	0,995	0,523	0,251	0,172	0,121	0,068
Відкоректована оптична густина	2,407	1,556	0,927	0,455	0,183	0,104	0,053	-

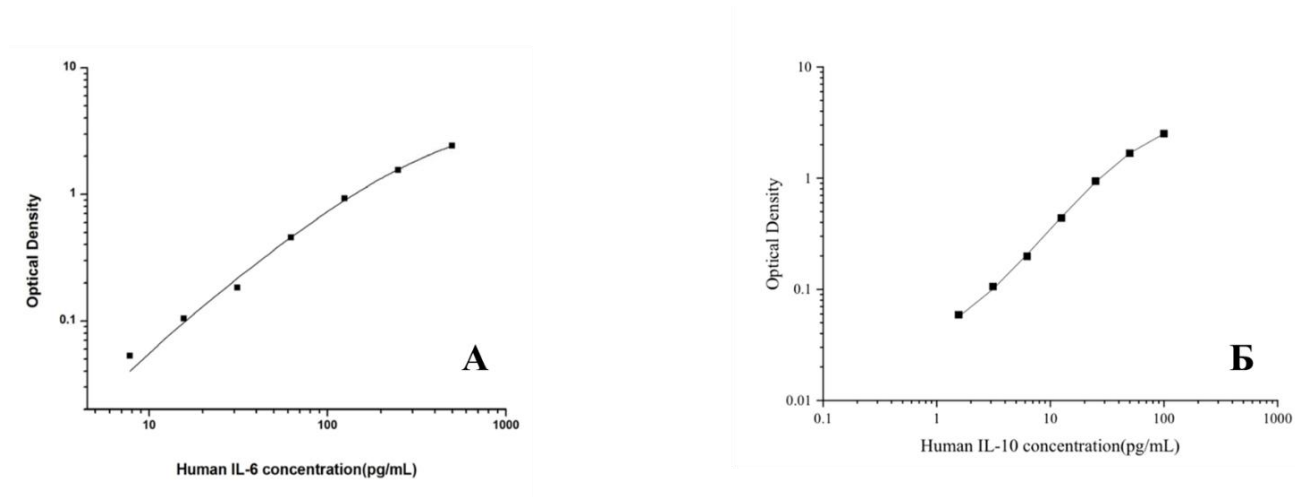


Рис. 2.1 Параметри калібрувальної кривої для визначення ІЛ-6 (А) та ІЛ-10 (Б)

Таблиця 2.5

Значення оптичної густини стандартів ІЛ-10 для побудови калібрувальної кривої

Концентрація (пг/мл)	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0
Оптична густина	2,596	1,754	1,021	0,519	0,279	0,187	0,14	0,081
Відкоректована оптична густина	2,515	1,673	0,94	0,438	0,198	0,106	0,059	

2.6. Визначення експресії генів та мікроРНК методом кількісної полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі

Для визначення рівнів експресії мРНК та мікроРНК у пухлинній тканині хворих на РМЗ застосовували метод ПЛР.

Тотальну РНК виділяли з парафінових блоків пухлинної тканини за допомогою комерційного набору RNeasy FFPE Kit (QIAGEN, Німеччина) відповідно до інструкції виробника. Концентрацію та чистоту виділеної РНК визначали на спектрофотометрі NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific, США)

за співвідношенням оптичної густини при довжинах хвиль 260 та 280 нм. До проведення подальших досліджень РНК зберігали при температурі -20°C .

Для аналізу експресії мРНК кДНК синтезували зі 100 нг загальної РНК із використанням набору LunaScript™ RT SuperMix Kit (New England Biolabs, США) для зворотної транскрипції. Визначення рівнів експресії генів *SPP1* та *SPARC* здійснювали методом ПЛР із використанням специфічних праймерів, послідовності яких наведено в таблиці 2.6, та реакційної суміші Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) (Thermo Scientific, США).

Експресію мікроРНК визначали методом stem-loop ПЛР із використанням специфічних stem-loop праймерів для синтезу кДНК та універсального зворотного (reverse) праймера (5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3') відповідно до модифікованої методики Marcial-Quino та співавт [117] адаптованої для використання з комерційним набором LunaScript™ RT SuperMix (New England, США). Послідовності праймерів для виявлення мікроРНК були отримані за допомогою ресурсу <http://genomics.dote.hu:8080/mirnadestool/> та синтезовані компанією Metabion, Німеччина (табл. 2.6.)

Таблиця 2.6

Послідовності праймерів для оцінки експресії мРНК та мікроРНК у пухлинній тканині хворих на рак молочної залози

мікроРНК	stem-loop праймер	forward праймер
miR-155-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC TCGTGA	3'-GGG GTT AAT GCT AAT CGT GAT A -'5
miR-26a-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC TCGTGA	3'- CCG CCG TTC AAG TAA TCC AG -'5
miR-18a-5p	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGG TATTCGCACCAGAGCCAAC TCGTGA	3'- CAC GCG TAA GGT GCA TCT AGT -'5
мРНК	Forward Sequence	Reverse Sequence
<i>ACTB</i>	5'- CAC TTT CTA CAA TGA GCT GCG- 3'	5'- CTG GAT GGC TAC GTA CAT GG-3'

мікроРНК	stem-loop праймер	forward праймер
<i>IL6</i>	5'- AGACAGCCACTCACCTCTTCAG - 3'	5'- TTCTGCCAGTGCCTCTTTG CTG -3'
<i>IL10</i>	5'- TCTCCGAGATGCCTTCAGCAGA - 3'	5'- TCAGACAAGGCTTGGCAA CCCA -3'
<i>SPP1</i>	5' - CGAGGTGATAGTGTGGTTTATGG- 3'	5' - GCACCATTCAACTCCTCG CTTTC- 3'
<i>SPARC</i>	5' - TGCCTGATGAGACAGAGGTGGT- 3'	5' - CTTCGGTTTCCTCTGCACC ATC- 3'

Ампліфікацію проводили у реакційній суміші Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2×) (Thermo Scientific, США). Склад реакційних сумішей та умови проведення ампліфікації наведено в таблиці 2.7–2.8.

Таблиця 2.7

Склад реакційної суміші для ПЛР

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

Таблиця 2.8

Умови проведення ПЛР (кількість зразка – 20 мкл)

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

Як ендogenousний контроль при визначенні експресії мікроРНК використовували RNU48, послідовності праймерів до якого були отримані з ресурсу NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) та синтезовані компанією Metabion (Німеччина): RT-праймер: 5'-CTCTGACC-3'; forward: 5'-AGTGATGATGACCCCAGGTAACCTC-3'; reverse: 5'-CTGCGGTGATGGCATCAG-3'. Для нормалізації експресії мРНК використовували мРНК β-актину (ACTB).

Усі реакції виконували у трьох технічних повторях. Для кожного зразка визначали середнє значення порогового циклу (Ct) за результатами триплікатів. Значення Ct досліджуваних генів і мікроРНК нормалізували відносно відповідних ендogenousних контролів. Відносний рівень експресії мРНК та мікроРНК визначали порівняльним методом $2^{-\Delta Ct}$ [118], де $\Delta Ct = Ct$ (досліджуваного гена або мікроРНК) – Ct (ендogenousного контролю).

2.7. Методи статистичної обробки одержаних результатів

Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism v.8.0 (GraphPad Software Inc., США). Для статистичного аналізу використовували методи описової статистики, а також параметричні та непараметричні методи аналізу.

Перед проведенням статистичного аналізу оцінювали характер розподілу даних. Кількісні показники з нормальним розподілом представляли у вигляді середнього арифметичного та стандартної похибки середнього ($M \pm$

m), тоді як при ненормальному розподілі дані представляли у вигляді медіани та міжквартильного інтервалу ($Me (Q1-Q3)$).

Для порівняння двох незалежних груп використовували t-критерій Стьюдента у разі параметричного розподілу даних або U-критерій Манна-Уїтні — у разі непараметричного розподілу.

Для кількісного порівняння трьох і більше незалежних груп застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) у разі параметричного розподілу даних. За ненормального розподілу використовували критерій Краскела-Уолліса (Kruskal-Wallis test) з подальшим множинним порівнянням за критерієм Dunn (Dunn's multiple comparisons test). Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. ОСОБЛИВОСТІ ІНФІЛЬТРАЦІЇ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН МАСТОЦИТІВ У НОВОУТВОРЕННЯХ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

3.1. Порівняльна характеристика мастоцитарної компоненти доброякісних і злоякісних новоутворень молочної залози

Для порівняльної оцінки інфільтрації та функціонального стану МС досліджували тканину ФА і РМЗ. У тканині РМЗ МС виявляли як у паренхіматозній, так і у стромальній компонентах пухлини. За морфологічними ознаками розрізняли недегранульовані клітини зі збереженими цитоплазматичними гранулами та дегранульовані клітини з виходом гранулярного вмісту у навколишню тканину (рис. 3.1).

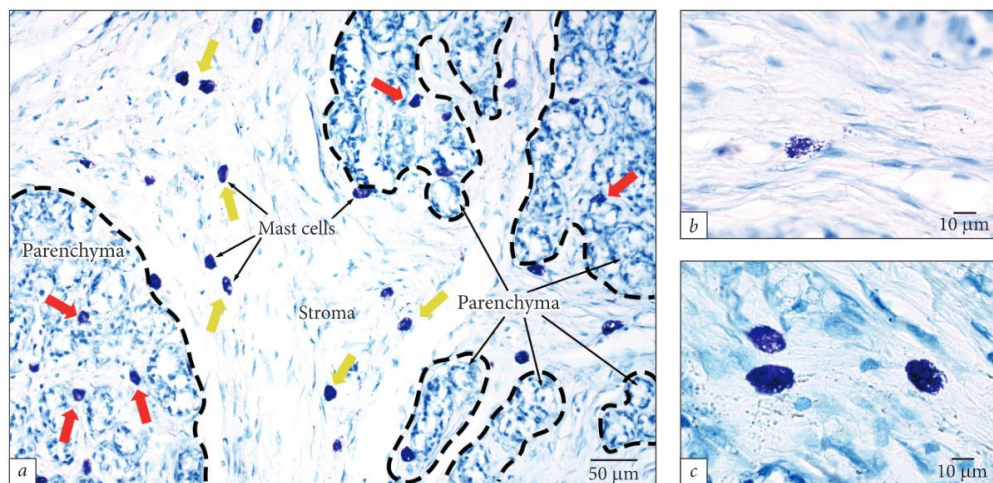


Рис. 3.1 Локалізація та функціональний стан МС у тканині РМЗ: а — МС у паренхімі (червоні стрілки) та стромі (жовті стрілки); б — дегранульований мастоцит; с — недегранульовані мастоцити. Забарвлення толуїдиновим синім.

Порівняльний аналіз показав, що загальний рівень інфільтрації МС у тканині РМЗ був у 2,0 раза вищим, ніж у тканині ФА ($p = 0,0491$). Найбільш виражені відмінності стосувалися інтратуморальної локалізації: у РМЗ кількість МС у паренхіматозному компоненті пухлини була у 5,9 раза

більшою порівняно з ФА ($p = 0,0004$). Водночас статистично значущих відмінностей щільності стромальної інфільтрації між доброякісними та злоякісними новоутвореннями молочної залози не встановлено (рис. 3.2, а–b).

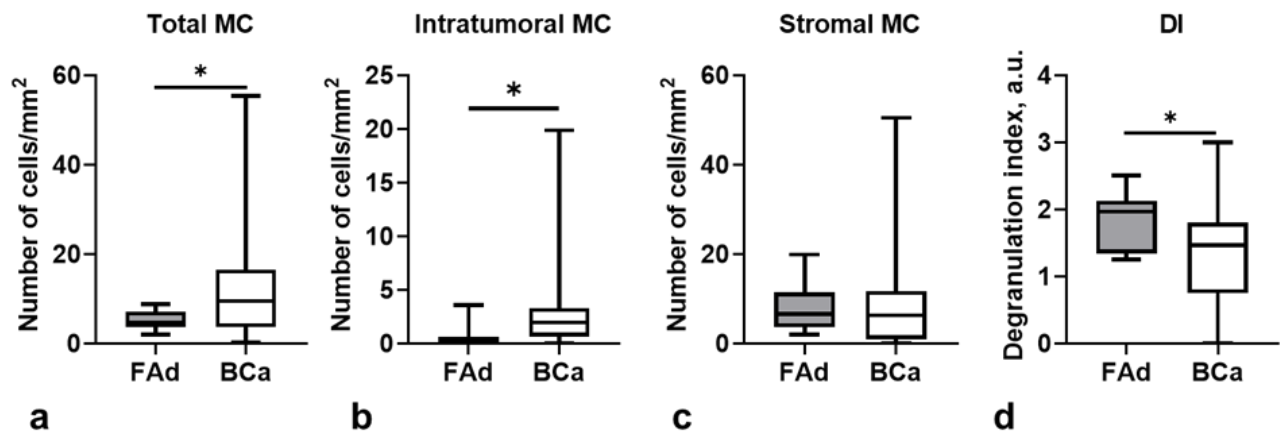


Рис. 3.2 Показники загальної (а), інтратуморальної (b) і стромальної (c) інфільтрації та індексу дегрануляції (DI) MC (d) у тканині ФА і РМЗ.

Примітка * — відмінності статистично значущі, $p < 0,05$.

Функціональна активність MC у досліджуваних новоутвореннях мала іншу спрямованість: індекс дегрануляції у тканині ФА був на 34 % вищим порівняно з тканиною РМЗ ($p = 0,0368$) (рис. 3.2, d). Отже, для РМЗ було характерне збільшення кількості мастоцитів, насамперед за рахунок їх інтратуморальної локалізації, тоді як у ФА спостерігали вищий рівень дегрануляції.

3.2. Зв'язок мастоцитарної інфільтрації та функціональної активності з клініко-патологічними характеристиками раку молочної залози

Подальший аналіз був спрямований на визначення зв'язку загальної, інтратуморальної та стромальної інфільтрації MC із клініко-патологічними характеристиками РМЗ. У пухлинах категорії T1 рівень інтратуморальної інфільтрації був у 1,9 раза вищим порівняно з новоутвореннями категорії T2

($p = 0,037$). Натомість за наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів щільність стромальної інфільтрації перевищувала відповідний показник у групі N0 на 45,1 % ($p = 0,017$) (рис. 3.3, а, b).

Зі зниженням ступеня диференціювання пухлини змінювалися не лише кількісні показники, а й топологічний розподіл МС. Для РМЗ ступеня G3 був характерний нижчий загальний рівень інфільтрації порівняно з високодиференційованими новоутвореннями ($p = 0,049$). При цьому кількість МС в інтратуморальній зоні зменшувалася ($p = 0,021$), тоді як у стромальному компоненті пухлини, навпаки, зростала ($p = 0,042$) (рис. 3.3, b). Статистично значущого зв'язку показників інфільтрації зі стадією пухлинного процесу та гістологічним типом РМЗ не виявлено (рис. 3.3, с, d).

Аналіз залежно від молекулярного підтипу засвідчив, що пухлини люмінального Б і потрійно-негативного підтипів характеризувалися вищими показниками загальної інфільтрації МС, а також більшою їх кількістю в інтратуморальному та стромальному компонентах порівняно з новоутвореннями люмінального А та HER2/neu-позитивного підтипів (рис. 3.3, е).

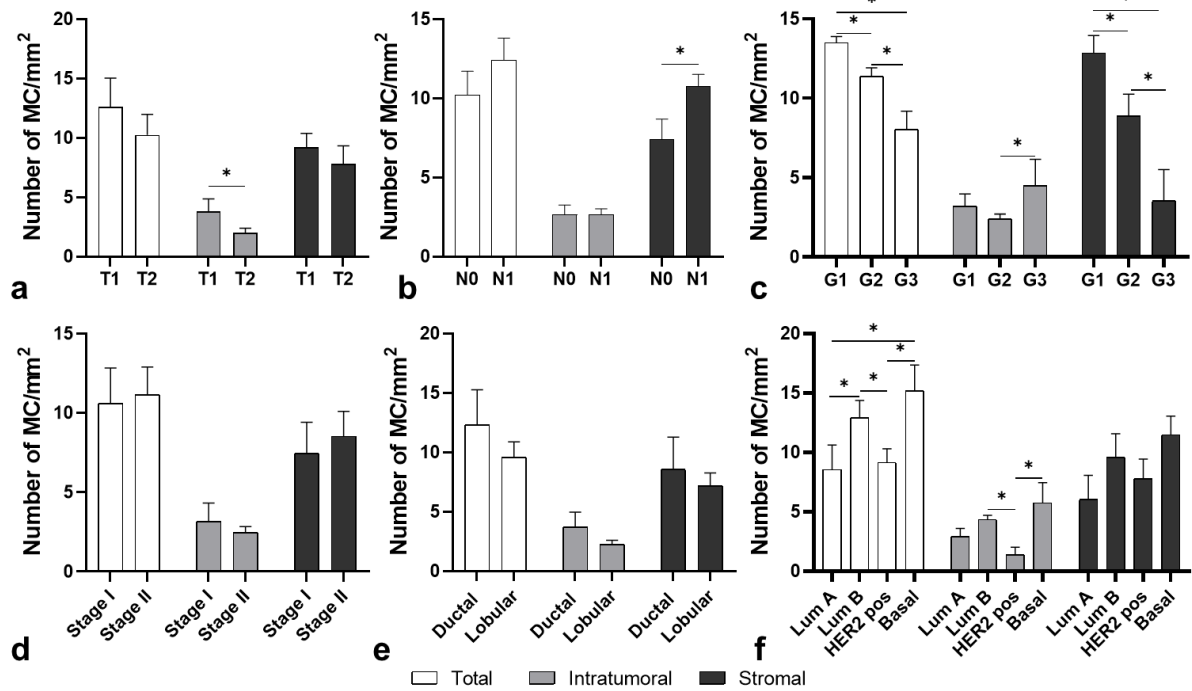


Рис. 3.3. Зв'язок показників інфільтрації мастоцитами з клініко-патологічними характеристиками РМЗ: а — розмір первинної пухлини (категорія Т); б — стан регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N); в — ступінь диференціювання пухлини (G); г — стадія пухлинного процесу; д — гістологічний тип; е — молекулярний підтип.

Примітка * — відмінності статистично значущі, $p < 0,05$

Зв'язку щільності інфільтрації МС зі статусом рецепторів естрогену та прогестерону не встановлено (рис. 3.4, а, б). Водночас у HER2/neu-позитивних пухлинах загальна кількість МС була на 35,5 % вищою порівняно з HER2/neu-негативними новоутвореннями ($p=0,031$). Зростання інфільтрації спостерігали як в інтратуморальному — на 44,1 % ($p = 0,019$), так і у стромальному — на 30,6 % ($p = 0,009$) компонентах пухлини (рис. 3.4, б).

Найбільш виражені відмінності встановлено залежно від проліферативної активності РМЗ. У пухлинах із рівнем експресії Ki-67 > 14 % загальна інфільтрація МС була у 5,7 раза вищою, ніж у новоутвореннях із Ki-67 < 14 % ($p = 0,002$). Кількість МС в інтратуморальній і стромальній

ділянках при високій проліферативній активності перевищувала відповідні показники у 3,5 та 3,6 раза (в обох випадках $p = 0,006$) (рис. 3.4, d).

Оцінка функціональної активності МС показала, що індекс дегрануляції був пов'язаний із низкою клініко-патологічних характеристик РМЗ (табл. 3.1). У тканині пухлин І стадії цей показник був на 31,6 % нижчим, ніж у новоутвореннях ІІ стадії. Для пухлин категорії Т1 індекс дегрануляції був на 28,0 % меншим порівняно з категорією Т2 ($p = 0,029$), а за наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів — у 1,23 раза вищим, ніж у групі N0.

Встановлено обернений зв'язок між ступенем диференціювання РМЗ та функціональною активністю МС: із переходом від G1 до G3 індекс дегрануляції послідовно зростав. У PR-негативних пухлинах рівень дегрануляції був на 32,7% вищим порівняно з PR-позитивними новоутвореннями. Водночас статистично значущих відмінностей індексу дегрануляції залежно від гістологічного типу, молекулярного підтипу, статусу ER і HER2/neu, а також рівня експресії Ki-67 не виявлено.

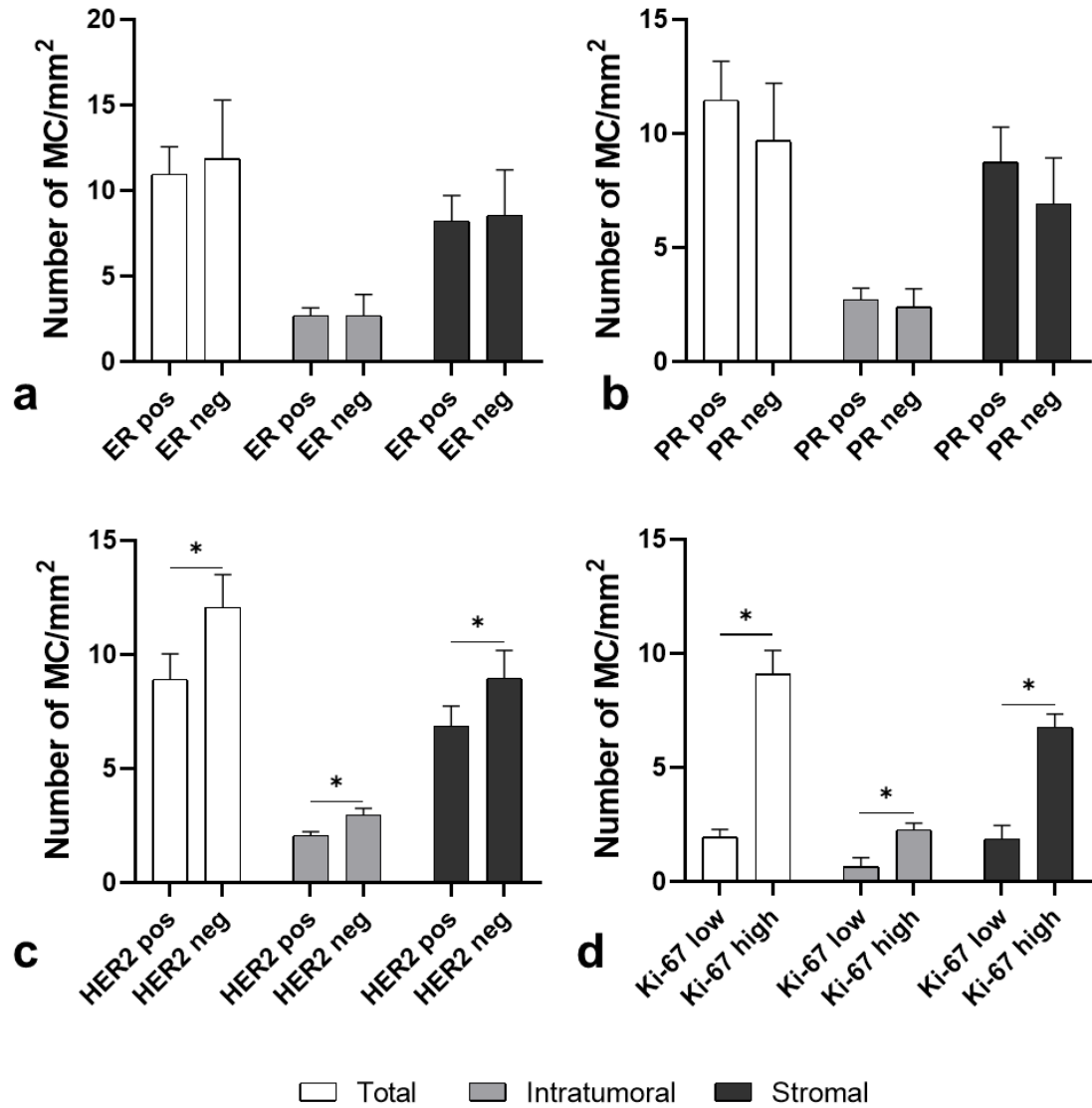


Рис. 3.4. Зв'язок показників інфільтрації мастоцитами з молекулярно-біологічними характеристиками РМЗ: а — статус рецепторів естрогену; б — статус рецепторів прогестерону; с — статус HER2/neu; д — проліферативна активність за рівнем експресії Ki-67. Примітка: * — відмінності статистично значущі, $p < 0,05$.

Таблиця 3.1

Індекс дегрануляції мастоцитів залежно від клініко-патологічних характеристик РМЗ

Характеристика	Група	Індекс дегрануляції МС, ум. од.
Клінічна стадія	I	1,152 ± 0,1324
	II	1,517 ± 0,1144
Розмір пухлини (T)	T1	1,129 ± 0,156
	T2	1,447 ± 0,1206
Стан регіонарних лімфатичних вузлів (N)	N0	1,248 ± 0,1137
	N1	1,539 ± 0,1785
Гістологічний тип	Протокова аденокарцинома	1,313 ± 0,203
	Часточкова аденокарцинома	1,331 ± 0,1093
Ступінь диференціювання (G)	G1	1,252 ± 0,0778
	G2	1,495 ± 0,0985
	G3	1,737 ± 0,1601
Молекулярний підтип	Люмінальний А	1,271 ± 0,1362
	Люмінальний Б	1,552 ± 0,1945
	HER2/neu-позитивний	1,264 ± 0,2657
	Базальний/потрійно-негативний	1,598 ± 0,1459
Статус ER	позитивний	1,375 ± 0,1125
	негативний	1,364 ± 0,1923
Статус PR	позитивний	1,237 ± 0,1151
	негативний	1,642 ± 0,1667
Статус HER2/neu	позитивний	1,306 ± 0,1865
	негативний	1,371 ± 0,1135
Проліферативна активність	Ki-67 < 14 %	1,583 ± 0,321
	Ki-67 > 14 %	1,484 ± 0,306

Примітка. Жирним шрифтом виділено показники, між якими виявлено статистично значущі відмінності ($p < 0,05$).

Таким чином, кількісні показники інфільтрації МС та їх функціональна активність були пов'язані з різними клініко-патологічними характеристиками

пухлинного процесу. Щільність інфільтрації асоціювалася з розміром первинної пухлини, станом регіонарних лімфатичних вузлів, ступенем диференціювання, молекулярним підтипом, статусом HER2/neu та проліферативною активністю. Індекс дегрануляції змінювався залежно від стадії пухлинного процесу, категорій T і N, ступеня диференціювання та статусу PR. Отримані результати свідчать про неоднорідність розподілу і функціонального стану МС у тканині РМЗ залежно від клініко-біологічних особливостей новоутворення.

Гістохімічне визначення ступеня зрілості мастоцитів ґрунтувалося на особливостях забарвлення їхніх цитоплазматичних гранул альціановим синім і сафраніном О. Гранули незрілих МС забарвлювалися альціановим синім у блакитний колір, тоді як гранули зрілих клітин набували рожевого забарвлення під дією сафраніну О. Для МС проміжного ступеня зрілості було характерне поєднання синіх і рожевих гранул або фіолетове забарвлення цитоплазми внаслідок накладання двох кольорів (рис. 3.5).

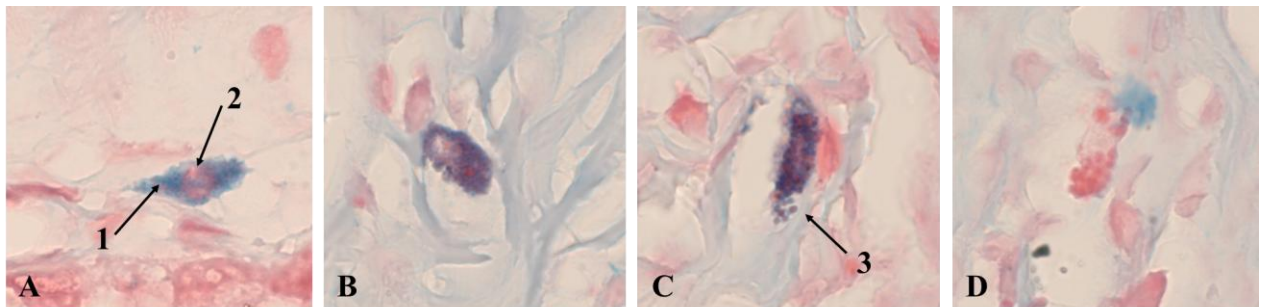


Рис. 3.5. Морфологічні ознаки МС різного ступеня зрілості у тканині РМЗ: А — незрілий мастоцит; В, С — мастоцити проміжного ступеня зрілості; D — зрілий мастоцит; 1 — цитоплазма, заповнена гранулами; 2 — ядро; 3 — дегрануляція. Гістохімічне фарбування альціановим синім і сафраніном О. Об. $\times 100$, ок. $\times 10$

Для кількісної характеристики ступеня зрілості МС проведено аналіз індексу зрілості мастоцитів (МСМІ) залежно від клініко-патологічних

характеристик РМЗ. Статистично значущої різниці між показниками МСМІ у тканині фіброаденом і РМЗ не встановлено ($p = 0,0980$).

Не виявлено залежності показників МСМІ від розміру первинної пухлини ($p = 0,6651$; рис. 3.6А). Водночас у пацієток без метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів значення МСМІ було в 1,23 раза вищим, ніж у хворих із метастазами в регіонарних лімфатичних вузлах ($p = 0,0053$; рис. 3.6, Б).

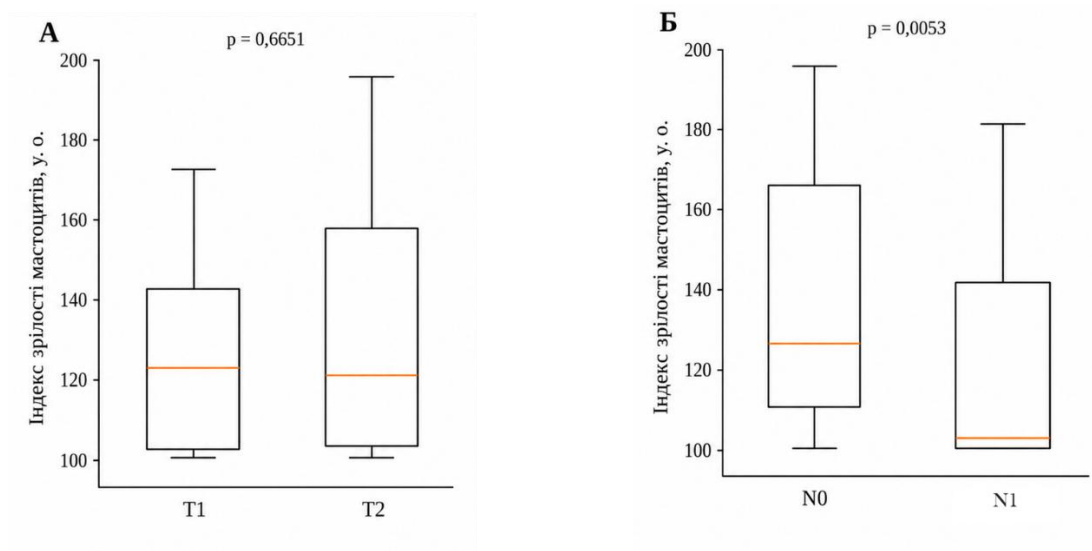


Рис. 3.6 Індекс зрілості мастоцитів у тканині РМЗ залежно від розміру первинної пухлини (категорія Т) (А) та стану регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N) (Б) за класифікацією TNM

Статистично значущих відмінностей МСМІ залежно від ступеня диференціювання ($p=0,8805$), гістологічного типу ($p = 0,1081$) та молекулярного підтипу РМЗ ($p = 0,1819$) не встановлено.

Також, не виявлено статистично значущих відмінностей МСМІ залежно від статусу рецепторів естрогену ($p = 0,2936$; рис. 3.7, А) та прогестерону ($p = 0,9019$; рис. 3.7, Б). Натомість у пухлинах, негативних за експресією HER2/неу значення МСМІ було в 1,38 раза вищим, ніж у зразках

з позитивним статусом HER2/neu = 1+ ($p = 0,0121$; рис. 3.7, В). Статистично значущих відмінностей між групою HER2/neu = 3+ та іншими групами не встановлено.

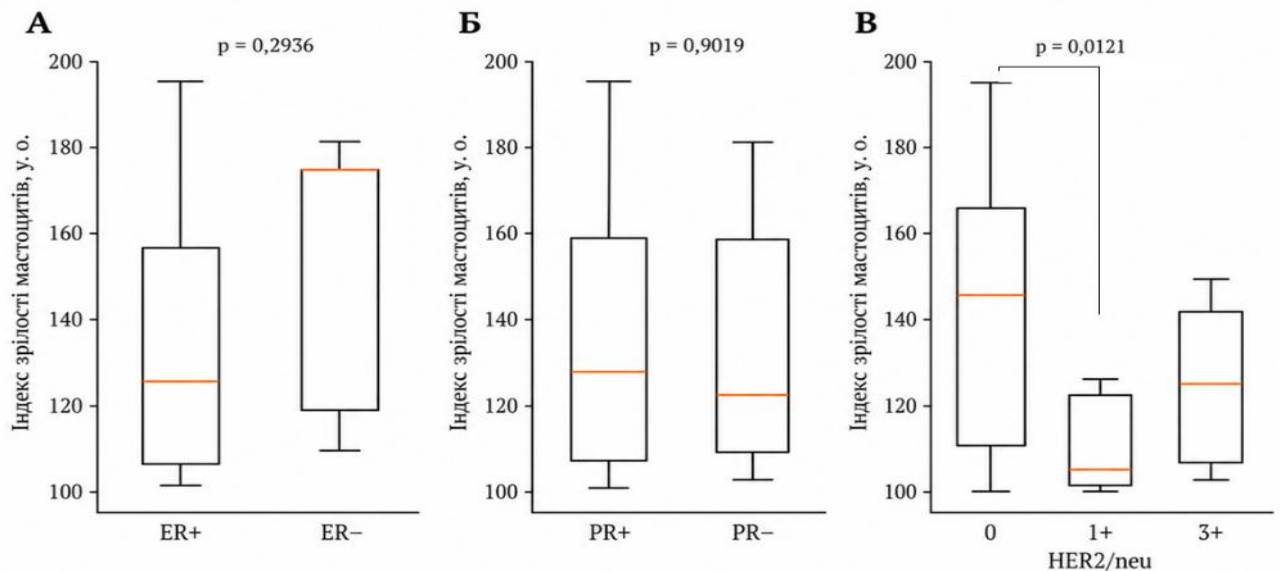


Рис. 3.7. Індекс зрілості мастоцитів у тканині РМЗ залежно від статусу рецепторів естрогену (А), прогестерону (Б) та HER2/neu (В)

Кореляційний аналіз не виявив статистично значущого зв'язку між МСМІ та загальною щільністю інфільтрації тканини мастоцитами ($r = 0,2519$; $p = 0,0777$), а також між МСМІ та індексом дегрануляції мастоцитів ($r = 0,0756$; $p = 0,6177$). Не встановлено також асоціацій МСМІ з кількістю мастоцитів інтратуморальної ($r = 0,0415$; $p = 0,7794$) або стромальної локалізації ($r = 0,2234$; $p = 0,1269$).

Отже, ступінь зрілості МС у тканині РМЗ був пов'язаний зі стадією захворювання, станом регіонарних лімфатичних вузлів, і статусом HER2/neu. Низьки значення МСМІ були характерними для метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів, та пухлин зі статусом HER2/neu. Водночас показник не залежав від розміру первинної пухлини, ступеня

диференціювання, гістологічного та молекулярного підтипів, статусу ER і PR, а також не корелював із кількісними показниками мастоцитарної інфільтрації та дегрануляції.

До обмежень проведеного дослідження належать нижчі специфічність і селективність гістохімічного фарбування порівняно з імуногістохімічним визначенням хімази та триптази або проточною цитометрією.

Результати проведених досліджень в розділі 3, опубліковано у [119,120, 127, 131]

РОЗДІЛ 4. ЗНАЧЕННЯ ПУХЛИНО-АСОЦІЙОВАНИХ МАКРОФАГІВ У ФОРМУВАННІ СТУПЕНЯ ЗЛОЯКІСНОСТІ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

4.1. Морфофункціональна характеристика пухлино-асоційованих макрофагів у тканині раку молочної залози

За результатами ІГХ дослідження тканини РМЗ встановлено переважну локалізацію CD68⁺-макрофагів у стромальному компоненті пухлини. Клітини мали округлу або овальну форму та характеризувалися гранулярним цитоплазматичним забарвленням, що відповідало внутрішньоклітинній локалізації лізосомального білка CD68. Розподіл CD68⁺-клітин був дифузним, водночас в окремих ділянках спостерігали осередки помірної або високої щільності інфільтрації, зокрема поблизу скупчень злоякісно трансформованих клітин і судин (рис. 4.1, а, b).

CD163⁺-макрофаги відрізнялися переважно видовженою або амебоїдною формою та локалізувалися у глибоких ділянках пухлинної строми, поблизу зон некрозу, а також у периваскулярних і фіброзних ділянках. Така локалізація може свідчити про їх імунорегуляторну або репаративну функцію. Інтенсивність ІГХ реакції на CD163 була варіабельною; позитивні клітини зазвичай мали виражене темно-коричнєве цитоплазматичне забарвлення (рис. 4.1, с, d).

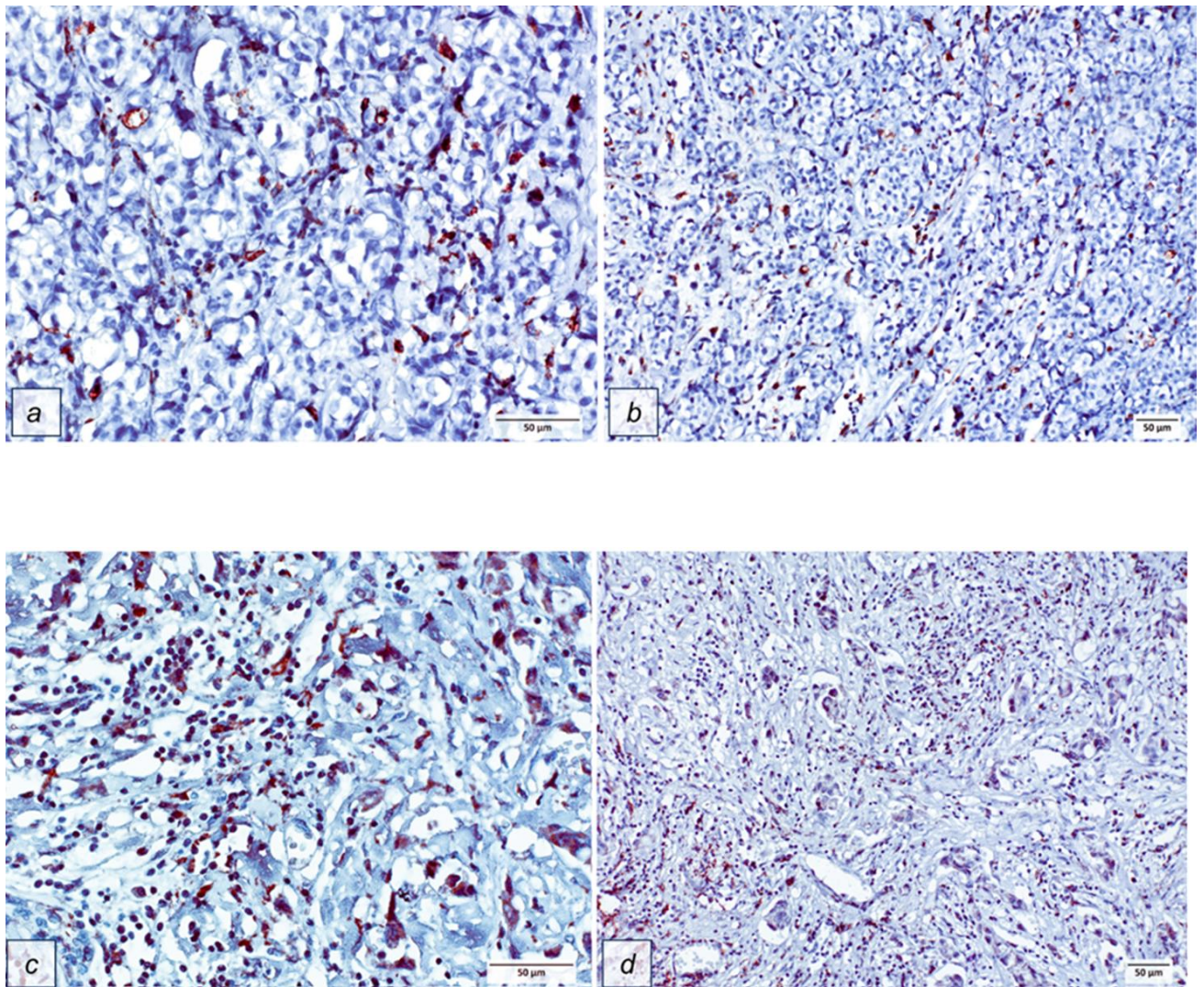


Рис 4.1. Репрезентативні мікрофотографії CD68⁺ -макрофагів (a, b) та CD163⁺ -макрофагів (c, d) у тканині РМЗ. Імуногістохімічне дослідження із застосуванням хромогену 3,3-діамінобензидин тетрахлориду; контрастне забарвлення гематоксиліном Мейєра.

4.2. Зв'язок макрофагального профілю раку молочної залози з клініко-патологічними та молекулярно-біологічними характеристиками пухлинного процесу

Аналіз кількісних показників експресії маркерів CD68 дозволив встановити достовірне зростання кількості загальних макрофагів у пухлинній тканині хворих на РМЗ залежно від стадії пухлинного процесу (рис. 4.2). Зростання рівня інфільтрації CD68⁺ макрофагів у 1,9 разів ($p = 0,004$) зафіксовано у зразках тканини РМЗ пацієнток із II стадією захворювання, порівняно із пухлинами I стадії.

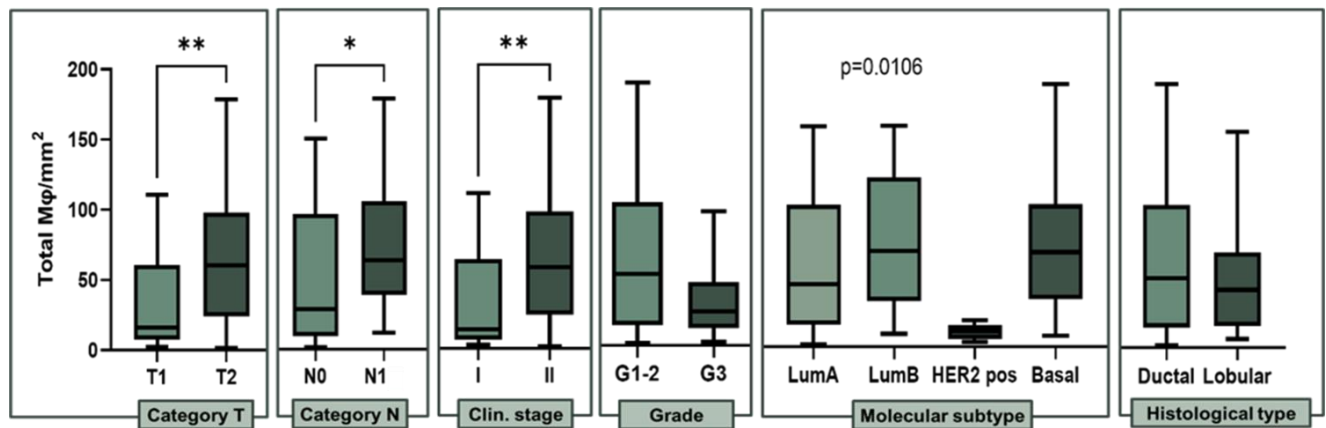


Рис. 4.2. Залежність рівнів інфільтрації макрофагів CD68⁺ у тканині РМЗ від клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу.

Примітки: * - різниця достовірна по відношенню до групи порівняння ($p < 0,05$), ** - $p < 0,005$

Доведено існування прямого зв'язку між рівнем інфільтрації макрофагів, позитивних за експресією CD68⁺, та розміром новоутворень РМЗ: у пацієнток із пухлинами категорії T2 рівень CD68⁺-клітин був вищим у 2,0 рази ($p = 0,026$) порівняно з категорією T1. Крім того, у випадках наявності метастазів у регіонарні лімфатичні вузли рівень CD68⁺ інфільтрації тканини РМЗ перевищував аналогічний показник у пухлинах хворих без метастазів у 1,4 рази ($p = 0,047$). Водночас статистично значущих

змін рівнів інфільтрації пухлинної тканини молочної залози $CD68^+$ позитивними макрофагами у новоутвореннях різного гістологічного типу не виявлено.

Інтенсивність інфільтрації макрофагами також залежала від ступеня диференціювання пухлини. Зокрема, у зразках низькодиференційованого РМЗ рівень $CD163^+$ М2-макрофагів був у 3,6 раза вищим ($p = 0,024$) порівняно з високодиференційованими карциномами (рис. 4.3).

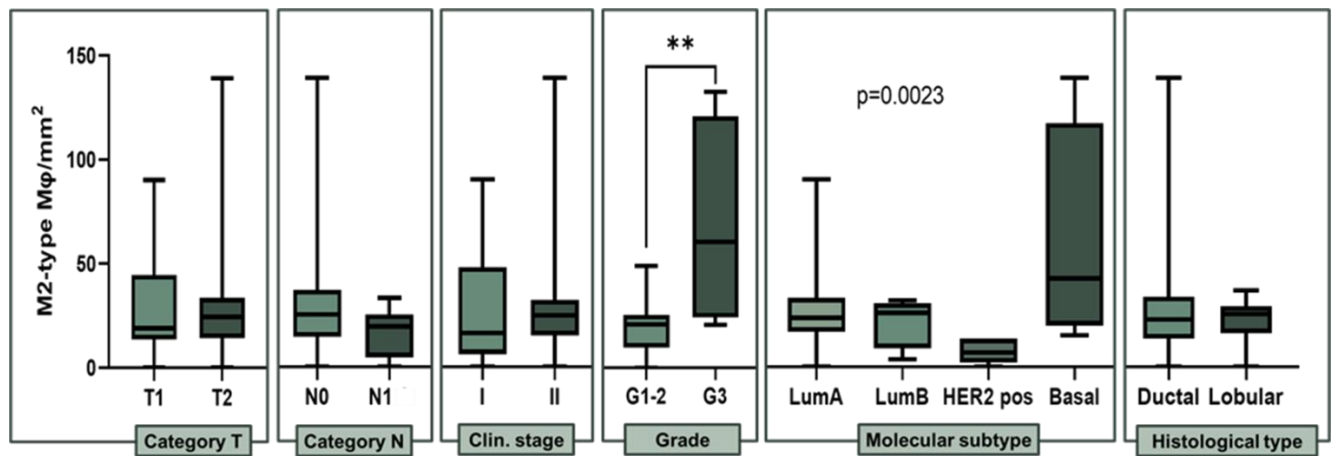


Рис. 4.3. Залежність рівня інфільтрації $CD163^+$ макрофагів у тканині РМЗ від клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу.

Примітка. ** — різниця статистично значуща, $p < 0,005$.

Крім того, встановлено відмінності у рівні інфільтрації макрофагами залежно від молекулярного підтипу РМЗ: щільність $CD68^+$ і $CD163^+$ клітин була значно вищою у пухлинах базального підтипу порівняно з люмінальними РМЗ та HER2/неу-позитивними новоутвореннями ($p = 0,010$).

Статистично значущих відмінностей у рівні інфільтрації $CD163^+$ макрофагів залежно від категорій Т та N, а також стадії та гістологічного типу РМЗ не виявлено (рис. 4.3).

Проведений аналіз співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ клітин у тканині РМЗ дозволив встановити його залежність від стадії захворювання, ступеня диференціювання пухлини та її молекулярного підтипу (рис. 4.4). Зокрема, у

пухлинній тканині хворих на РМЗ категорії T2 за системою TNM зафіксовано суттєве підвищення співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ ($2,847 \pm 0,574$; $p = 0,026$) порівняно з пацієнтками категорії T1, що свідчить про зміну балансу макрофагальних популяцій у бік переважання загальної макрофагальної інфільтрації над представленістю $CD163^+$ M2-подібних клітин. Подібні зміни встановлено у хворих із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів: співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ у категорії N^+ досягало $4,172 \pm 1,214$ ($p = 0,019$) порівняно з пацієнтами категорії $N0$.

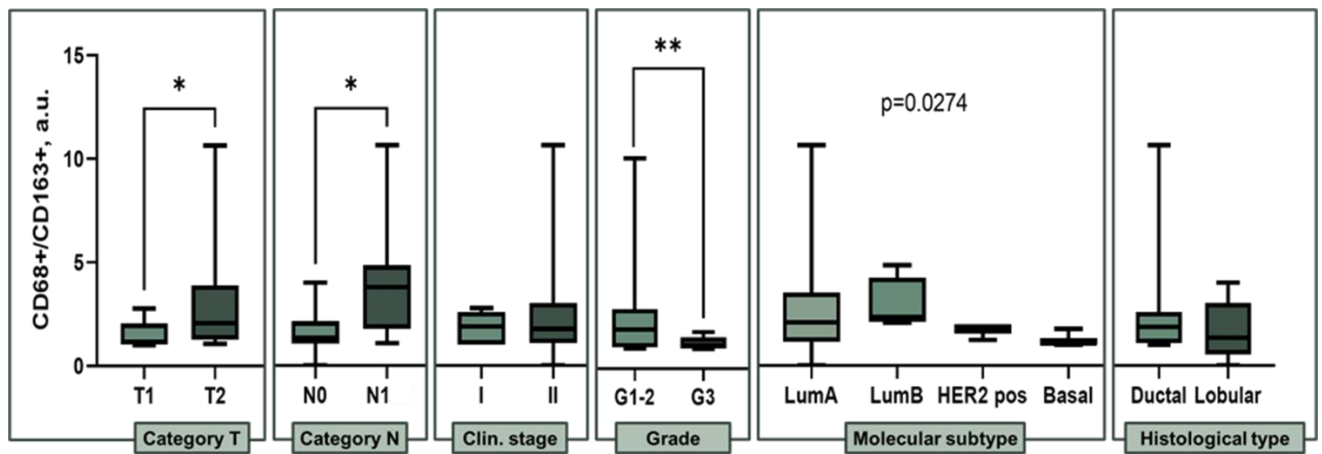


Рис.4.4. Залежність співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ макрофагів у тканині РМЗ від клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу.

Примітки: * — різниця статистично значуща, $p < 0,05$; ** — різниця статистично значуща, $p < 0,005$.

На противагу цьому, у новоутвореннях базального молекулярного підтипу співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ було значно меншим ($1,192 \pm 0,117$; $p = 0,027$), що вказує на домінування M2-поляризованих макрофагів, асоційованих із підтримкою пухлинного росту, ангіогенезом та пригніченням протипухлинного імунітету. Подібні зміни були зафіксовані і у тканині РМЗ низького ступеня диференціювання (G3), для яких також було характерне зниження співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ ($1,289 \pm 0,153$; $p = 0,045$).

Аналіз рівня інфільтрації пухлинної тканини макрофагами CD163⁺ продемонстрував пряму кореляційну залежність експресії цього маркера від рецепторного статусу РМЗ. Зокрема, у тканині РМЗ, позитивного за експресією ER та PR кількість CD163⁺ клітин була у 2,9 рази ($p = 0,033$) та у 2,4 рази ($p = 0,012$) більшою, ніж у ER⁻ та PR⁻ пухлинах. У тканині HER2/neu-негативних новоутворень рівень CD163⁺ інфільтрації був у 2,9 рази вищим ($p = 0,004$) порівняно з HER2/neu-негативними пухлинами (рис.4.5), що може свідчити про посилену імуносупресивну активність у пухлинному мікрооточенні.

Водночас, залежність між інфільтрацією CD163⁺ макрофагами та проліферативною активністю пухлини, оціненою за індексом Ki-67, не була статистично значущою. Також не встановлено достовірного зв'язку між рівнем інфільтрації CD68⁺ макрофагами та експресією рецепторів ER, PR, HER2/neu або індексом Ki-67.

Натомість, у зразках з високим індексом Ki-67 (>14%) зафіксовано збільшення у 1,9 рази співвідношення CD68/CD163, ніж у пухлинах з низьким рівнем проліферації ($p = 0,004$), що може свідчити про переважання макрофагів M1-фенотипу у новоутвореннях з більш агресивним фенотипом. Не виявлено залежності співвідношення CD68/CD163 від рецепторного статусу (ER, PR, HER2/neu) РМЗ (рис.4.5).

Таким чином, зростання інфільтрації CD68⁺ макрофагами у тканині РМЗ асоціюється зі збільшенням стадії захворювання та розміру пухлини (категорія T), а також наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Підвищення рівня CD163⁺ макрофагів M2-подібного фенотипу зафіксовано у тканині низькодиференційованого РМЗ, а також у новоутвореннях базального молекулярного підтипу. Найменшу кількість CD68⁺, так і CD163⁺ макрофагів виявлено у новоутвореннях люмінальних та HER2/neu-позитивного підтипу.

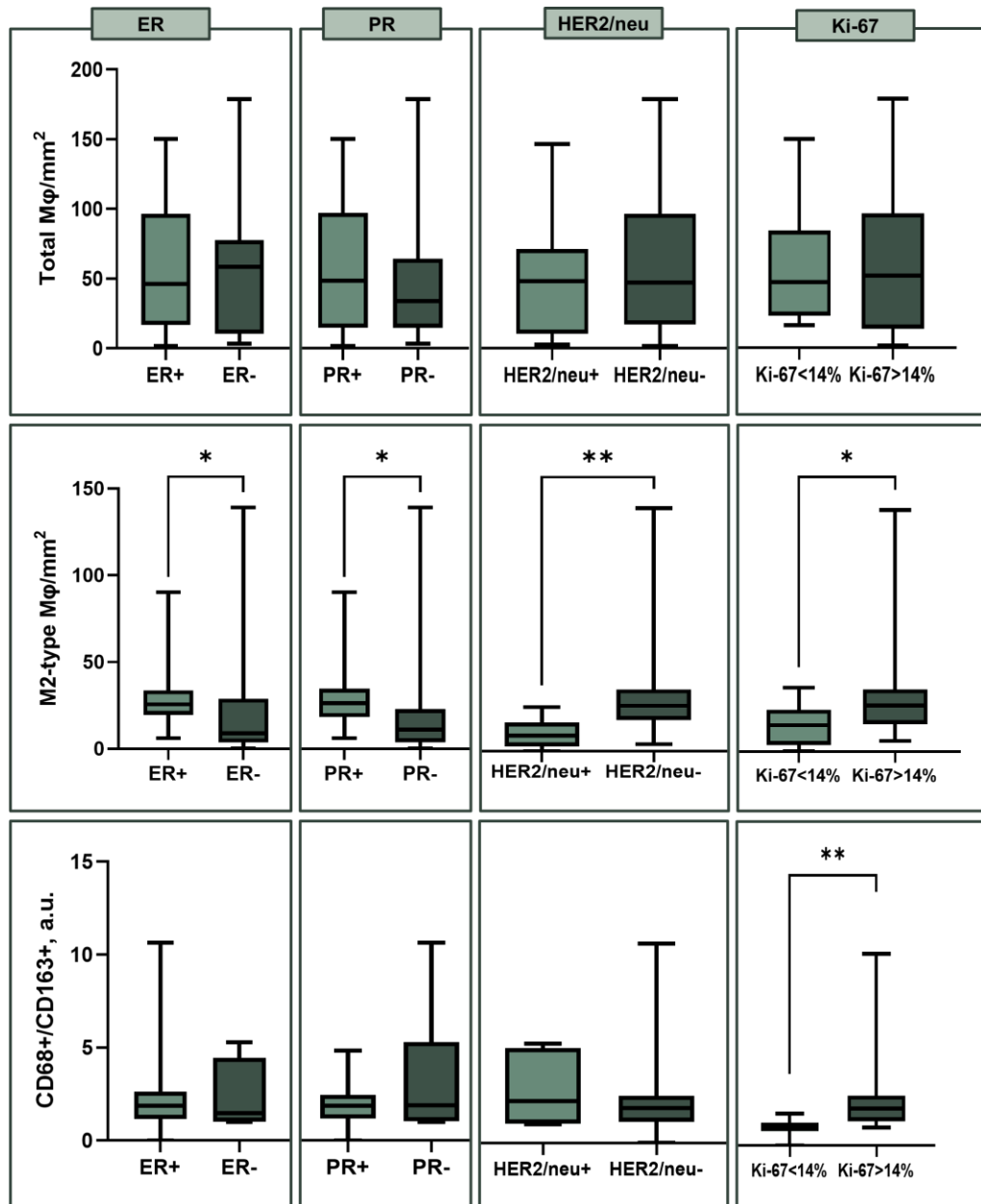


Рис. 4.5. Зв'язок рівнів інфільтрації пухлино асоційованих макрофігав із рецепторним статусом та проліферативною активністю РМЗ.

Примітки: * — різниця статистично значуща, $p < 0,05$; ** — різниця статистично значуща, $p < 0,005$.

Отже, характерною ознакою РМЗ категорій T2 та N1 є підвищення загальної макрофагальної інфільтрації та співвідношення $CD68^+ / CD163^+$, що свідчить про зміну балансу макрофагальних популяцій у бік переважання $CD68^+$ -клітин над $CD163^+$ M2-подібними макрофагами. Водночас при

базальному підтипі РМЗ і низькому ступені диференціювання пухлини (G3) спостерігається переважання CD163⁺ M2-подібних макрофагів, що може сприяти формуванню імуносупресивного мікрооточення та підвищенню ступеня злоякісності.

Результати проведених досліджень в розділі 4, опубліковано у [121,122, 129, 130]

РОЗДІЛ 5. ЦИТОКІНОВИЙ ПРОФІЛЬ ТА ЕПІГЕНЕТИЧНА РЕГУЛЯЦІЯ ІМУННОГО МІКРООТОЧЕННЯ У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ З РІЗНИМ КЛІНІЧНИМ СТАТУСОМ

5.1. Експресія циркулюючих та пухлино-асоційованих ІЛ-6 та ІЛ-10 у хворих на рак молочної залози

Проведено аналіз зв'язку показників ІЛ-6 та ІЛ-10 у хворих на РМЗ із основними клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу. Встановлено, що рівні досліджуваних цитокінів варіювали залежно від розміру первинної пухлини, статусу регіонарних лімфатичних вузлів, стадії захворювання та молекулярного підтипу РМЗ, проте статистично значущих відмінностей між досліджуваними групами не виявлено ($p > 0,05$; табл. 5.1)

Таблиця 5.1

Рівні ІЛ-6 та ІЛ-10 у сироватці крові хворих на РМЗ

Показник (pg/ml)	Середнє значення ($M \pm m$)	Медіана, Me (Q1–Q3)	Індивідуальні коливання	
			Мінімум	Максимум
ІЛ-6	64,29 $\pm$ 15,11	28,04 (13,73-85,10)	6,47	270,2
ІЛ-10	6,17 $\pm$ 1,468	2,68 (1,22-9,88)	0,00	24,88

Примітка. $M \pm m$ — середнє арифметичне $\pm$ стандартна похибка середнього (SEM, Standard Error of Mean)

Встановлено тенденцію до підвищення рівнів цитокінів у пацієнток із початковою стадією РМЗ. Так, у хворих із T1-категорією новоутворень медіанні показники ІЛ-6 у 1,8 рази перевищували аналогічні значення у пацієнтів із T2-пухлинами та становили Me=47,26 пг/мл (Q1=14,9; Q3=120,8) проти Me=26,86 пг/мл (Q1=11,13; Q3=52,11) відповідно. Подібна закономірність простежувалась і при оцінці статусу регіонарних

лімфатичних вузлів: у групі N0 медіанні рівні IL-6 були дещо вищими порівняно з пацієнтами із метастатичним ураженням лімфатичних вузлів (N1) — Me=28,04 пг/мл (Q1=17,11; Q3=94,32) проти Me=22,94 пг/мл (Q1=9,80; Q3=51,13), що відповідало різниці у 1,2 рази (рис. 5.1, А,Б).

При аналізі залежно від стадії пухлинного процесу встановлено, що у хворих із I стадією РМЗ рівні IL-6 залишались вищими порівняно з пацієнтками із II стадією захворювання. Медіанні значення цитокіну у даній групі становили Me=59,41 пг/мл (Q1=14,90; Q3=189,4), тоді як у пацієнток із II стадією — Me=28,04 пг/мл (Q1=11,72; Q3=51,13), що свідчило про збільшення показників у 2,1 рази (рис. 5.1, В)

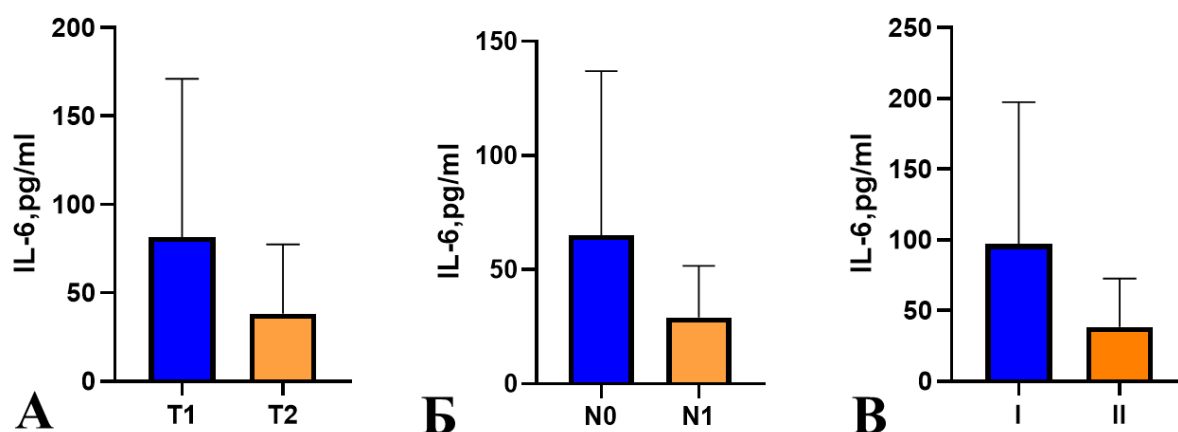


Рис. 5.1. Залежність рівнів IL-6 у хворих на РМЗ від категорії Т (А), статусу регіонарних лімфатичних вузлів (Б) та стадії пухлинного процесу (В) за TNM-класифікацією

Порівняння різних молекулярних підтипів РМЗ засвідчило найбільш високі рівні IL-6 у хворих із базальним підтипом пухлини. Зокрема, медіанні показники у цій групі досягали Me=102,8 пг/мл (Q1=84,71; Q3=120,8), що у 2,5, 4,0 та 5,7 рази перевищувало відповідні значення у пацієнток із люмінальним А, люмінальним Б та HER2-позитивним підтипами, для яких медіанні рівні IL-6 становили Me=40,98 пг/мл (Q1=24,31; Q3=94,22), Me=25,98 пг/мл (Q1=12,26; Q3=79,80) та Me=18,04 пг/мл (Q1=8,04;

Q3=28,04) відповідно (рис. 5.2, А)

Окремої уваги заслуговує ідентифікований зв'язок між рівнями IL-6 та ступенем диференціювання новоутворень. Виявлено, що для низькодиференційованих пухлин характерні значно вищі показники цитокіну порівняно з G1-2 новоутвореннями. Так, медіанні рівні IL-6 у групі G3 становили Me=85,49 пг/мл (Q1=26,28; Q3=129,0), тоді як у групі G1-2 — Me=25,69 пг/мл (Q1=12,55; Q3=40,98), що відповідало різниці у 3,3 рази (рис.5.2, Б)

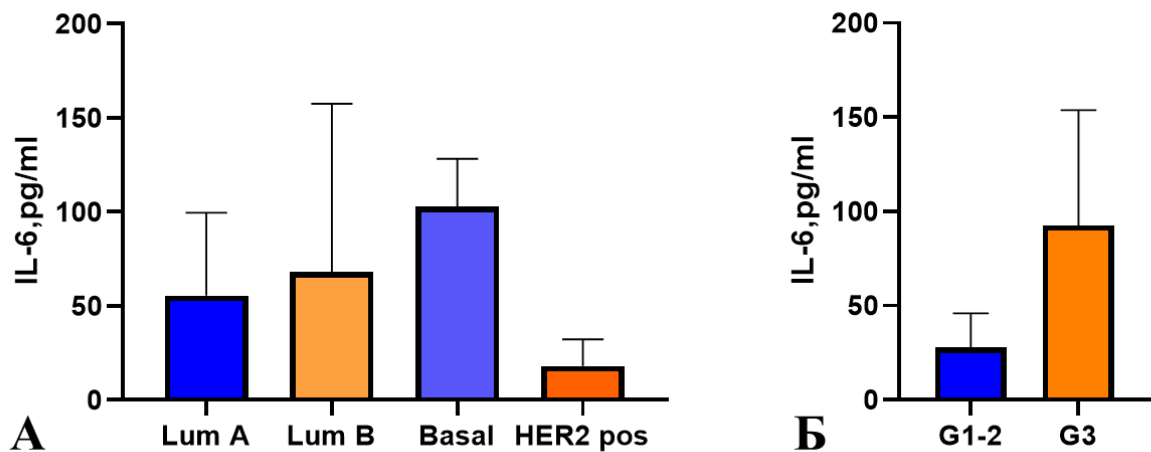


Рис. 5.2. Залежність рівнів IL-6 у хворих на РМЗ від молекулярного підтипу (А) та ступеня диференціювання новоутворень (Б)

Аналіз рівнів IL-10 у хворих на РМЗ залежно від основних клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу продемонстрував значну варіабельність показників у досліджуваних групах (рис. 5.3). При оцінці залежно від Т-категорії пухлини встановлено, що у пацієнток із T1-новоутвореннями медіанні рівні IL-10 були дещо вищими порівняно з T2-пухлинами та становили Me=3,902 пг/мл (Q1=1,707; Q3=10,98) проти Me=3,781 пг/мл (Q1=0,7318; Q3=9,695) відповідно (рис. 5.3, А).

Подібна тенденція спостерігалась і при аналізі статусу регіонарних лімфатичних вузлів. Так, у хворих без метастатичного ураження лімфатичних

вузлів (N0) медіанні показники IL-10 були у 3,0 рази вищими порівняно з пацієнтами групи N1 та становили $Me=5,122$ пг/мл ($Q1=1,464$; $Q3=11,84$) проти $Me=1,707$ пг/мл ($Q1=1,463$; $Q3=4,391$) відповідно (рис. 5.3, Б).

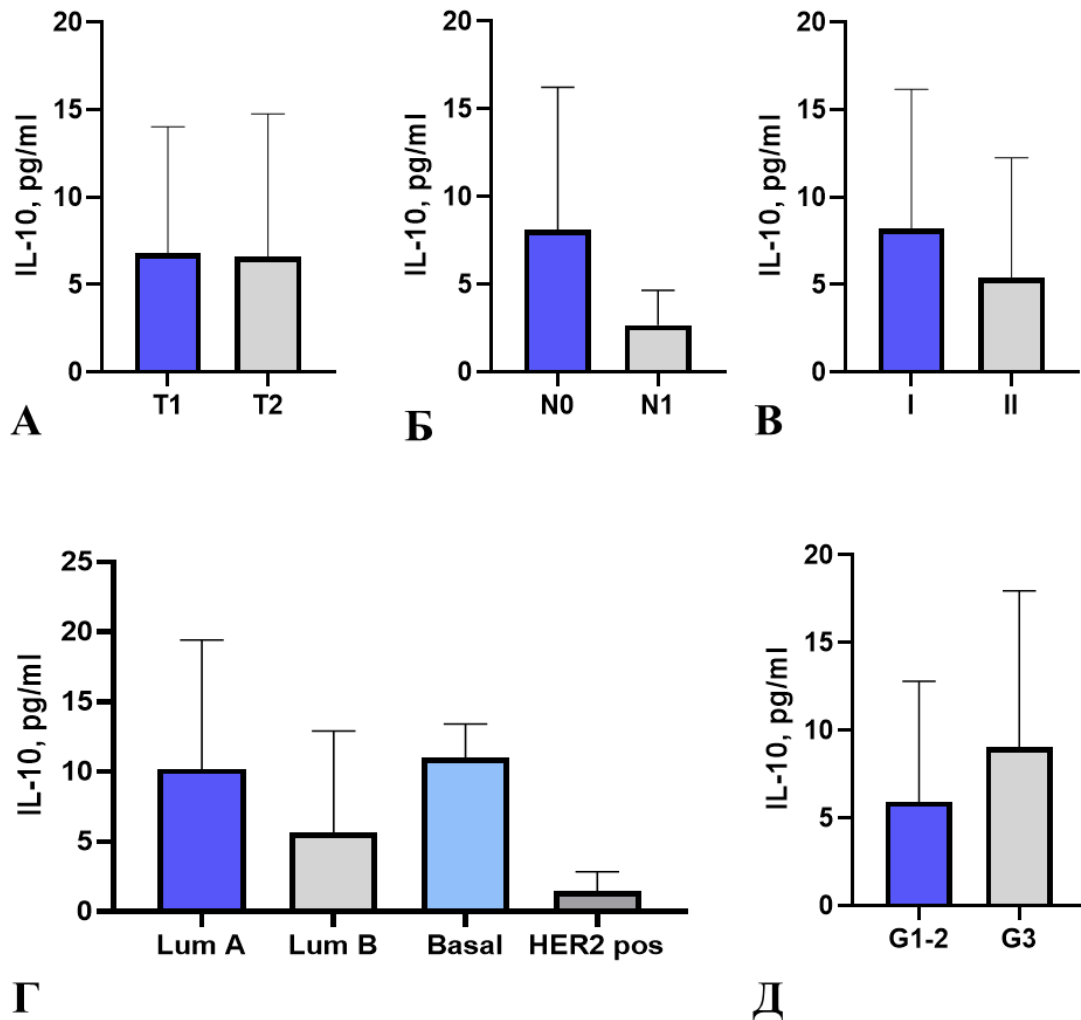


Рис. 5.3. Залежність рівнів IL-10 у хворих на РМЗ від основних клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу: категорії Т(А), статусу регіонарних лімфатичних вузлів (Б), стадії захворювання (В), молекулярного підтипу РМЗ (Г) та ступеня диференціювання новоутворень (Д).

При оцінці рівнів IL-10 залежно від стадії пухлинного процесу встановлено переважання більш високих показників у пацієнтів із I стадією РМЗ. Зокрема, медіанні рівні цитокіну у даній групі становили $Me=3,902$

пг/мл ($Q_1=1,951$; $Q_3=12,70$), тоді як у хворих із II стадією захворювання — $Me=2,561$ пг/мл ($Q_1=1,463$; $Q_3=7,012$), що відповідало різниці у 1,5 рази (рис. 5.3, В).

Порівняльний аналіз молекулярних підтипів РМЗ засвідчив найбільш високі рівні ІЛ-10 у хворих із базальним підтипом пухлини та люмінальним А підтипом (рис. 5.3, Г). Так, медіанні показники ІЛ-10 у пацієнток із базальним РМЗ становили $Me=10,99$ пг/мл ($Q_1=9,268$; $Q_3=12,70$), що у 3,8 та 7,5 рази перевищувало аналогічні значення у хворих із люмінальним Б та HER2-позитивним підтипами відповідно. Водночас у пацієнтів із люмінальним А підтипом медіанні рівні цитокіну становили $Me=10,49$ пг/мл ($Q_1=2,317$; $Q_3=17,93$), що також перевищувало показники люмінального Б та HER2-позитивного підтипів.

Аналіз взаємозв'язку між рівнями ІЛ-10 та ступенем диференціювання РМЗ показав тенденцію до підвищення показників цитокіну у низькодиференційованих новоутвореннях. Так, у хворих із G3 пухлинами медіанні рівні ІЛ-10 були у 2,5 рази вищими порівняно з G1-2 новоутвореннями та становили $Me=6,585$ пг/мл ($Q_1=1,829$; $Q_3=15,75$) проти $Me=2,683$ пг/мл ($Q_1=1,220$; $Q_3=8,903$) відповідно (рис. 5.3, Д).

На наступному етапі проведено аналіз рівнів мРНК *IL6* та *IL10* у сироватці крові хворих на РМЗ залежно від основних клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу. Встановлено, що показники експресії досліджуваних цитокінів характеризувалися значною варіабельністю у досліджуваних групах та змінювалися залежно від ступеня розповсюдженості РМЗ, молекулярного підтипу та ступеня диференціювання новоутворень. Водночас статистично значущих відмінностей між досліджуваними групами не виявлено ($p>0,05$).

В той же час, простежувалась тенденція до підвищення показників експресії мРНК *IL10* у пацієнток із більш поширеним пухлинним процесом. Зокрема, у хворих із T2-новоутвореннями та II стадією РМЗ медіанні рівні мРНК *IL10* були вищими у зіставленні з відповідними групами порівняння та

становили $Me=0,06147$ у.о. ($Q1=0,03765$; $Q3=0,1332$) і $Me=0,05227$ у.о. ($Q1=0,02798$; $Q3=0,09748$) відповідно (табл. 5.2).

При оцінці статусу регіонарних лімфатичних вузлів встановлено, що у пацієнтів без метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N0) медіанні показники мРНК *IL10* перевищували аналогічні значення у групі N1 та становили $Me=0,04365$ у.о. ($Q1=0,02959$; $Q3=0,06744$) проти $Me=0,02798$ у.о. ($Q1=0,01685$; $Q3=0,09229$) відповідно.

Порівняльний аналіз молекулярних підтипів РМЗ продемонстрував найбільш високі рівні експресії мРНК *IL10* у хворих із люмінальним Б підтипом пухлини — $Me=0,04585$ у.о. ($Q1=0,01928$; $Q3=0,1321$). Водночас для базального та HER2-позитивного підтипів були характерні нижчі показники експресії досліджуваного маркера (табл. 5.2).

Оцінка взаємозв'язку між рівнями мРНК *IL10* та ступенем диференціювання пухлинної РМЗ не виявила суттєвих міжгрупових відмінностей, хоча у G2 новоутвореннях спостерігалась тенденція до більш високих значень експресії досліджуваного маркера порівняно з G3 пухлинами (табл. 5.2).

При оцінці взаємозв'язку між рівнями мРНК *IL6* та ступенем розповсюдженості пухлинного процесу встановлено різноспрямовані тенденції змін показників (табл. 5.2). Зокрема, у пацієнтів із T2-новоутвореннями медіанні рівні мРНК *IL6* були дещо вищими порівняно з хворими із T1-пухлинами та становили $Me=2,768$ у.о. ($Q1=0,8357$; $Q3=6,212$) проти $Me=2,599$ у.о. ($Q1=1,300$; $Q3=11,27$) відповідно. Аналогічна тенденція спостерігалась і при аналізі стадії пухлинного процесу: у хворих із II стадією РМЗ медіанні показники експресії мРНК *IL6* перевищували аналогічні значення у пацієнтів із I стадією захворювання та становили $Me=2,768$ у.о. ($Q1=0,8357$; $Q3=6,554$) проти $Me=2,599$ у.о. ($Q1=2,123$; $Q3=11,27$) відповідно.

Водночас при оцінці статусу регіонарних лімфатичних вузлів встановлено більш високі рівні мРНК *IL6* у пацієнтів із метастатичним ураженням лімфатичних вузлів. Так, у групі N1 медіанні показники експресії

були у 2,5 рази вищими порівняно з групою N0 та становили $Me=5,738$ у.о. ($Q1=1,070$; $Q3=9,757$) проти $Me=2,320$ у.о. ($Q1=0,8357$; $Q3=3,723$) відповідно.

Таблиця 5.2

Показники експресії мРНК *IL6* та *IL10* у сироватці крові хворих на РМЗ залежно від ступеня розповсюдженості пухлинного процесу та молекулярного підтипу новоутворень

Клініко-патологічний показник	Група	мРНК <i>IL6</i> , у.о. ($M \pm m$)	мРНК <i>IL10</i> , у.о. ($M \pm m$)
Т-категорія	T1	6,573 $\pm$ 2,125	0,04581 $\pm$ 0,0106
	T2	3,327 $\pm$ 0,946	0,1035 $\pm$ 0,0374
N-категорія	N0	4,294 $\pm$ 1,621	0,0710 $\pm$ 0,0215
	N1	6,122 $\pm$ 2,265	0,0458 $\pm$ 0,0171
Стадія захворювання	I	6,817 $\pm$ 2,689	0,0493 $\pm$ 0,0131
	II	4,119 $\pm$ 1,223	0,0828 $\pm$ 0,0274
Молекулярний підтип	Lum A	5,908 $\pm$ 2,584	0,0375 $\pm$ 0,0054
	Lum B	4,276 $\pm$ 1,900	0,0734 $\pm$ 0,0199
	Basal	5,980 $\pm$ 5,286	0,0270 $\pm$ 0,0146
	HER2/neu pos	1,584 $\pm$ 1,185	0,0404 $\pm$ 0,0211
Ступінь диференціювання	G1-2	5,733 $\pm$ 1,890	0,0764 $\pm$ 0,0220
	G3	4,441 $\pm$ 1,485	0,0458 $\pm$ 0,0129

Примітка. $M \pm m$ — середнє арифметичне $\pm$ стандартна похибка середнього (SEM, Standard Error of Mean)

Оцінка взаємозв'язку між рівнями мРНК *IL6* та ступенем

диференціювання новоутворень продемонструвала тенденцію до підвищення показників новоутвореннях низького ступеня диференціювання. Так, у пацієнтів із G3 новоутвореннями медіанні значення експресії мРНК *IL6* становили $Me=2,916$ у.о. ($Q1=0,7658$; $Q3=7,727$) проти $Me=2,599$ у.о. ($Q1=0,9587$; $Q3=6,554$) у групі G2.

Порівняльний аналіз молекулярних підтипів РМЗ засвідчив найбільш високі рівні мРНК *IL6* у хворих із базальним підтипом пухлини. Зокрема, медіанні показники експресії у даній групі становили $Me=5,980$ у.о. ($Q1=0,6940$; $Q3=11,27$), що перевищувало аналогічні значення у пацієнтів із люмінальним А, люмінальним Б та HER2/neu-позитивним підтипами, для яких рівні мРНК *IL6* становили $Me=2,589$ у.о. ($Q1=1,201$; $Q3=7,202$), $Me=2,599$ у.о. ($Q1=0,7638$; $Q3=4,671$) та $Me=1,584$ у.о. ($Q1=0,3991$; $Q3=2,768$) відповідно.

Таким чином, проведений аналіз рівнів IL-6 та IL-10 у сироватці крові хворих на РМЗ на рівні білка та мРНК продемонстрував наявність варіабельності показників залежно від основних клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу. Встановлено тенденцію до підвищення рівнів досліджуваних цитокінів у хворих із більш агресивними молекулярними підтипами та низькодиференційованими новоутвореннями. Водночас статистично значущих відмінностей між більшістю досліджуваних груп не виявлено, що може бути пов'язано з обмеженим обсягом вибірки та значною індивідуальною варіабельністю показників.

5.1. Зв'язок цитокінового профілю зі ступенем макрофагальної інфільтрації пухлинної тканини у хворих на рак молочної залози

Наступним етапом дослідження став аналіз взаємозв'язків між показниками макрофагальної інфільтрації пухлинної тканини та рівнем циркулюючих цитокінів у крові хворих на РМЗ. З цією метою проведено порівняльний аналіз рівнів IL6 та IL10 у сироватці крові залежно від

інтенсивності інфільтрації пухлинної тканини $CD68^+$ та $CD163^+$ макрофагами.

Встановлено, що у пацієток із високими рівнями IL-10 та IL-6 у сироватці крові кількість $CD163^+$ пухлино-асоційованих макрофагів була відповідно у 12,01 раза ($p=0,0357$) та 5,11 раза ($p=0,0286$) вищою порівняно з пацієнтками, які мали низькі рівні цих цитокінів (Рис. 5.4, А, Б).

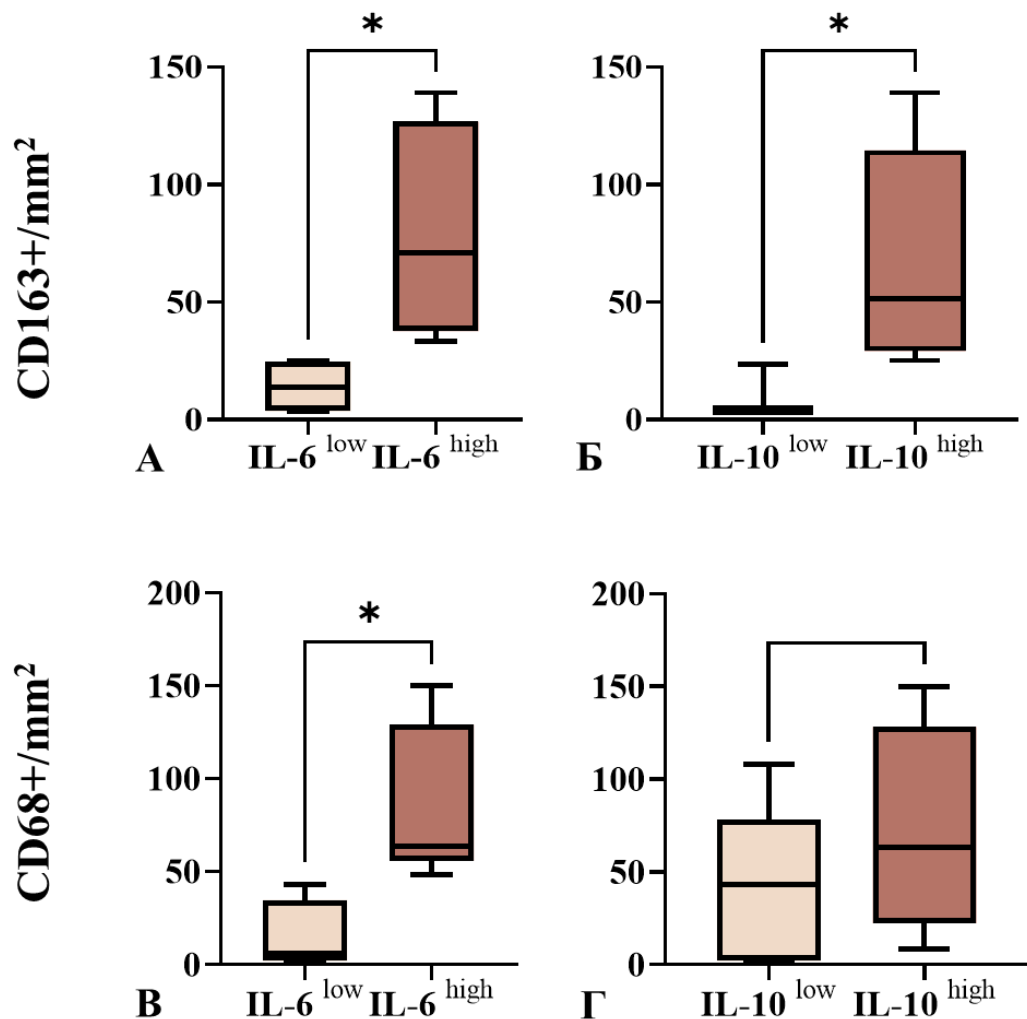


Рис. 5.4 Зв'язок показників макрофагальної інфільтрації пухлинної тканини з рівнем циркулюючих цитокінів у хворих на РМЗ.

Примітка. * – достовірні відмінності порівняно з групою низького рівня відповідного показника ($p<0,05$).

Водночас у пацієнток із високим рівнем IL-6 у сироватці крові кількість CD68⁺ макрофагів була у 11,14 раза більшою порівняно з групою хворих з низьким рівнем цього цитокіну ($p=0,0159$) (рис. 5.4, В).

Таким чином, підвищені рівні циркулюючих IL-6 та IL-10 асоціюються зі змінами макрофагальної інфільтрації пухлинної тканини у хворих на РМЗ: IL-6 пов'язаний зі збільшенням як CD68⁺, так і CD163⁺ макрофагів, тоді як IL-10 — переважно зі зростанням CD163⁺ субпопуляції.

Для подальшої характеристики взаємозв'язків між локальною цитокіновою відповіддю та макрофагальною інфільтрацією пухлинної тканини проаналізовано кількість CD68⁺ та CD163⁺ пухлино-асоційованих макрофагів залежно від рівнів експресії генів *IL6* та *IL10*.

Встановлено, що високі рівні експресії мРНК *IL6* та *IL10* асоціювалися зі збільшенням кількості CD163⁺ пухлино-асоційованих макрофагів відповідно у 5,97 раза ($p=0,0286$) та 4,86 раза ($p=0,0317$) порівняно з групою пацієнток з низькою експресією відповідних генів (рис. 5.5, А, Б).

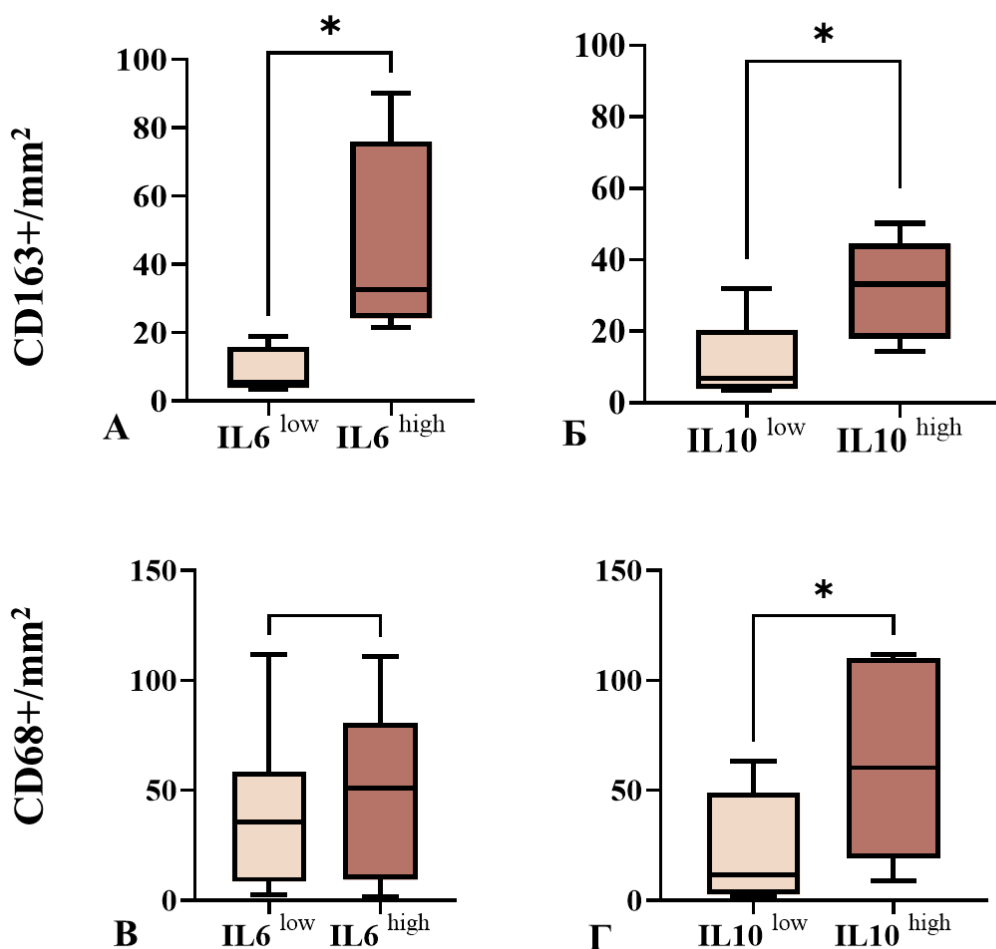


Рис. 5.5. Зв'язок показників макрофагальної інфільтрації пухлинної тканини з рівнем пухлино-асоційованих цитокінів у хворих на РМЗ.

Примітка. * – достовірні відмінності порівняно з групою низького рівня відповідного показника ($p < 0,05$).

Водночас високий рівень експресії мРНК *IL10* супроводжувався збільшенням кількості CD68⁺ пухлино-асоційованих макрофагів у 5,13 раза ($p = 0,0316$) порівняно з групою пацієнток з низькою експресією *IL10* (рис. 5.5, Г), тоді як для мРНК *IL6* статистично значущих відмінностей кількості CD68⁺ макрофагів не встановлено ($p = 0,5932$) (рис. 5.5, В).

Таким чином, підвищена локальна експресія генів *IL6* та *IL10* асоціюється зі збільшенням інфільтрації пухлинної тканини CD163⁺ макрофагами, тоді як підвищена експресія *IL10* також пов'язана зі збільшенням кількості CD68⁺ макрофагів.

5.3. Вивчення *in silico* та *ex vivo* мікроРНК, залучених до регуляції мікрооточення раку молочної залози

З метою обґрунтування вибору кандидатних мікроРНК, потенційно асоційованих із функціонуванням стромально-імунного мікрооточення РМЗ, нами проведено біоінформатичний аналіз із використанням платформи miRNet 2.0 (<https://www.mirnet.ca/>), що базується на експериментально верифікованих взаємодіях із бази даних TarBase. Аналіз був спрямований на ідентифікацію мікроРНК, потенційні гени-мішені яких беруть участь у регуляції міжклітинної комунікації, імунної відповіді, ремоделювання позаклітинного матриксу та пухлинної прогресії. За результатами аналізу для подальшого клінічного дослідження було відібрано hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-155-5p та hsa-miR-18a-5p.

Побудована у miRNet 2.0 мережа взаємодії показала, що miR-155-5p має найбільшу кількість потенційних генів-мішеней (937), тоді як для miR-26a-5p та miR-18a-5p їх кількість становила 455 та 266 відповідно (рис. 5.6).

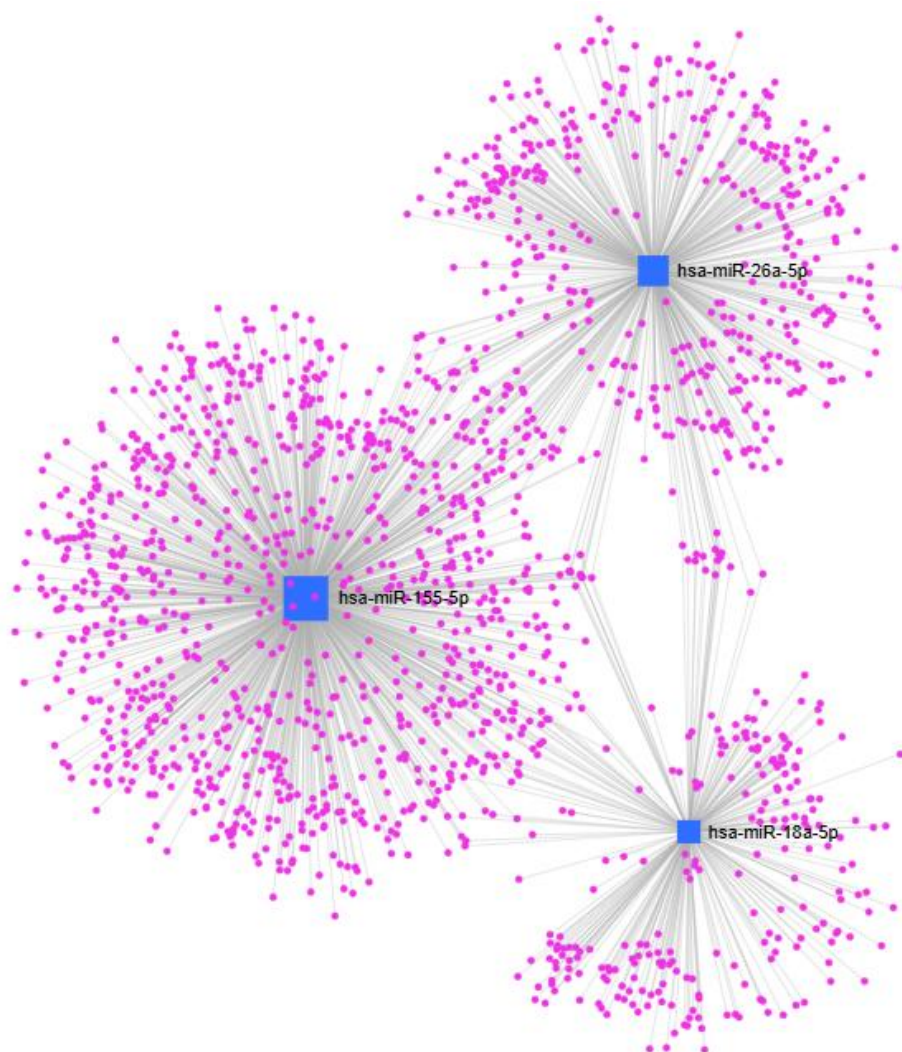


Рис. 5.6. Мережа взаємодії кандидатних мікроРНК за даними платформи miRNet 2.0 (TarBase).

Для оцінки ступеня перекриття регуляторних мереж досліджуваних мікроРНК побудовано діаграму Венна за допомогою вебресурсу InteractiVenn (рис. 5.7). Встановлено, що кожна з мікроРНК має значну кількість унікальних генів-мішеней (375 для miR-26a-5p, 845 для miR-155-5p та 212 для miR-18a-5p), що свідчить про їх специфічні механізми регуляції.

Разом із тим встановлено наявність значної кількості спільних генів-мішеней між окремими парами мікроРНК. Найбільше перекриття спостерігалось між miR-26a-5p та miR-155-5p, для яких виявлено 55 спільних генів-мішеней. До цієї групи належать гени *IL6*, *ICAM1*, *FOXO3*, *GSK3B*,

WNT5A, *RUNX2*, *NOS2*, *RRM2*, *WEE1*, *IRF4* та інші, що беруть участь у регуляції запальної відповіді, функціональної активності імунних клітин, міжклітинної взаємодії, міграції клітин, проліферації та ремоделювання позаклітинного матриксу.

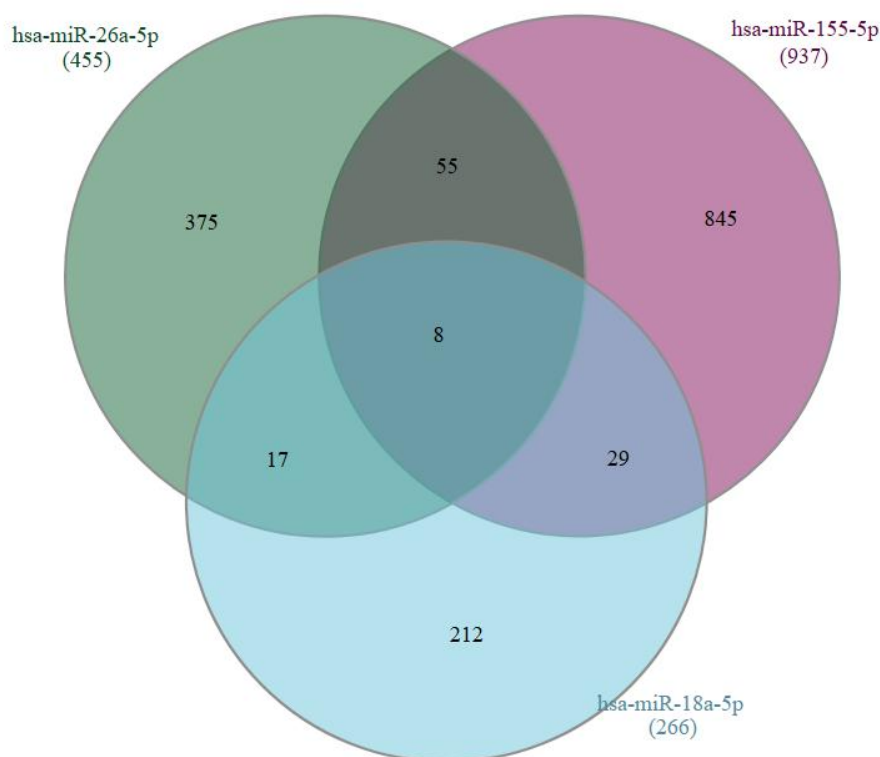


Рис. 5.7. Перетин множин потенційних генів-мішеней hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-155-5p та hsa-miR-18a-5p за результатами біоінформатичного аналізу.

Для пари miR-26a-5p та miR-18a-5p встановлено 17 спільних генів-мішеней, серед яких особливий інтерес становлять *PTEN*, *ESR1*, *TGFBR2*, *CTGF* та *ATM*. Ці гени залучені до контролю клітинного циклу, відповіді на пошкодження ДНК, передачі сигналів TGF- β , регуляції епітеліально-мезенхімального переходу, ремоделювання позаклітинного матриксу та гормональної чутливості пухлинних клітин.

Для miR-155-5p та miR-18a-5p виявлено 29 спільних потенційних генів-мішеней. До цієї групи входять *BCL2*, *HIF1A*, *SMAD2*, *SMAD3*, *THBS1*, *RICTOR*, *NR3C1*, *RORA* та інші гени, функціонування яких пов'язане з регуляцією апоптозу, клітинного метаболізму, ангіогенезу, відповіді на гіпоксію, сигнальними шляхами TGF- β та PI3K/AKT/mTOR, а також процесами формування пухлинного мікрооточення.

Також, встановлено, що hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-155-5p та hsa-miR-18a-5p мають 8 спільних потенційних генів-мішеней: *SMAD4*, *MYC*, *DNMT1*, *DCAF7*, *ZNF703*, *ZSWIM6*, *PSAT1* та *CCND1*, що свідчить про наявність узгоджених напрямів посттранскрипційної регуляції досліджуваних мікроРНК.

Особливий інтерес становили гени *IL6*, *PTEN*, *WNT5A*, *ICAM1*, *TGFBR2*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* та *THBS1*, які за даними літератури беруть безпосередню участь у регуляції рекрутування, поляризації та функціональної активності пухлинно-асоційованих макрофагів, а також диференціювання, активації та взаємодії мастоцитів із компонентами позаклітинного матриксу. Виявлення зазначених генів серед потенційних мішеней досліджуваних мікроРНК стало підґрунтям для вибору miR-26a-5p, miR-155-5p та miR-18a-5p для подальшого дослідження їх ролі у формуванні стромально-імунного мікрооточення РМЗ.

Для розширеної функціональної характеристики відібраних мікроРНК та обґрунтування доцільності їхнього подальшого аналізу виконано біоінформатичний скринінг за допомогою платформи ImmReg. Цей веб-ресурс дає змогу оцінити взаємозв'язок між рівнем експресії регуляторних молекул та ступенем інфільтрації пухлинного мікрооточення різними популяціями імунних клітин. Слід зазначити, що оцінка взаємозв'язків проводилася із застосуванням декількох незалежних алгоритмів деконволюції пухлинного мікрооточення (xCell, CIBERSORT, CIBERSORT-ABS, quanTIseq, TIMER, MCPcounter), що підвищує достовірність отриманих результатів.

Аналіз показав, що для miR-26a-5p у базі даних ImmReg інформація щодо асоціацій з інфільтрацією імунних клітин була відсутня, тоді як для miR-155-5p та miR-18a-5p виявлено численні статистично достовірні кореляційні взаємозв'язки з різними популяціями імунних клітин (табл. 5.3).

Таблиця 5.3

Кореляційні зв'язки експресії miR-26a-5p, miR-155-5p та miR-18a-5p із рівнем інфільтрації різних популяцій імунних клітин у пухлинному мікрооточенні

		miR-26a-5p	miR -155-5p	miR -18a-5p
Macrophage	p		1.299e-84	
	R		0.525	
	Source		XCELL	
M1 Macrophage	p		1.817e-166	1.825e-32
	R		0.689	0.335
	Source		CIBERSORT-ABS	XCELL
M2 Macrophage	p		2.454e-44	9.254e-27
	R		-0.391	-0.305
	Source		CIBERSORT	QUANTISEQ
Mast cell	p		1.022e-30	1.80e-43
	R		-0.327	-0.387
	Source		CIBERSORT	CIBERSORT
CD8+T cell	p		5.244e-117	
	R		0.601	
	Source		QUANTISEQ	
CD4+ T cell	p		6.275e-111	3.599e-99
	R		0.588	0.562
	Source		Th2_XCELL	Th2_XCELL

Продовження табл.5.3

		miR-26a-5p	miR -155-5p	miR -18a-5p
B cell	p		5.781e-116	
	R		0.599	
	Source		XCELL	
Monocyte	p		9.040e-71	
	R		0.485	
	Source		MCPCOUNTER	
Neutrophil	p		1.226e-62	2.479e-63
	R		0.459	-0.461
	Source		TIMER	MCPCOUNTER
B cell_	p		1.618e-57	
	R		0.441	
	Source		MCPCOUNTER	
T cell regulatory	p		1.056e-46	
	R		0.400	
	Source		CIBERSORT-ABS	
Immune score	p		6.706e-141	
	R		0.647	
	Source		XCELL	

Примітка: R — коефіцієнт кореляції; p — рівень статистичної значущості; Source — алгоритм оцінки імунної інфільтрації; порожні клітинки — статистично значущих асоціацій не виявлено.

Найбільшу кількість достовірних асоціацій виявлено для miR-155-5p. Експресія цієї мікроРНК прямо корелювала із загальною інфільтрацією макрофагів ($r=0,525$; $p=1,299 \times 10^{-84}$), M1-макрофагів ($r=0,335$;

$p=1,825 \times 10^{-32}$), $CD4^+$ Т-лімфоцитів ($r=0,562$; $p=3,590 \times 10^{-99}$), В-лімфоцитів ($r=0,599$; $p=5,781 \times 10^{-116}$) та моноцитів ($r=0,485$; $p=9,040 \times 10^{-71}$). Крім того, встановлено позитивні кореляції з нейтрофілами ($r=0,459$; $p=1,226 \times 10^{-62}$), регуляторними Т-лімфоцитами ($r=0,400$; $p=1,056 \times 10^{-46}$) та інтегральним показником імунної інфільтрації (Immune score) ($r=0,647$; $p=6,706 \times 10^{-141}$). Водночас для М2-макрофагів ($r=-0,305$; $p=9,254 \times 10^{-27}$) та мастоцитів ($r=-0,387$; $p=1,800 \times 10^{-43}$) встановлено обернені кореляційні взаємозв'язки.

Для miR-18a-5p кількість достовірних взаємозв'язків була меншою. Виявлено позитивний кореляційний зв'язок із М1-макрофагами ($r=0,335$; $p=1,825 \times 10^{-32}$), тоді як із М2-макрофагами ($r=-0,305$; $p=9,254 \times 10^{-27}$), мастоцитами ($r=-0,387$; $p=1,800 \times 10^{-43}$) та нейтрофілами ($r=-0,461$; $p=2,479 \times 10^{-63}$) встановлено обернені кореляційні взаємозв'язки.

Отримані результати свідчать, що відібрані мікроРНК асоційовані з інфільтрацією клітин вродженого та адаптивного імунітету, проте найбільш широкий спектр взаємозв'язків характерний для miR-155-5p. Особливу увагу привертають асоціації досліджуваних мікроРНК з макрофагами та МС — основними клітинними компонентами стромально-імунного мікрооточення, які були предметом подальшого експериментального дослідження в даній роботі. Саме тому результати аналізу ImmReg стали додатковим обґрунтуванням вибору miR-26a-5p, miR-155-5p та miR-18a-5p для подальшої оцінки їх експресії у клінічному матеріалі хворих на РМЗ

Наступним етапом біоінформатичного дослідження стала оцінка особливостей експресії відібраних мікроРНК безпосередньо у тканині раку молочної залози. З цією метою використано вебресурс UALCAN, який забезпечує доступ до даних проєкту TCGA-BRCA та дає змогу порівнювати рівні експресії мікроРНК у нормальній і пухлинній тканині, а також оцінювати їх зв'язок із показниками виживаності хворих. Проведений аналіз дозволив доповнити результати дослідження генів-мішеней та імунної

інфільтрації даними щодо клініко-біологічного значення miR-26a-5p, miR-155-5p та miR-18a-5p при РМЗ.

Як видно з даних, наведених на Рис. 5.8, медіанний рівень експресії hsa-miR-155 у тканині РМЗ становив 264,37 RPM, що у 1,86 раза перевищувало показник умовно нормальної тканини молочної залози — 142,14 RPM ($p=1,62 \times 10^{-12}$). Для пухлинних зразків також була характерна більша варіабельність її експресії.

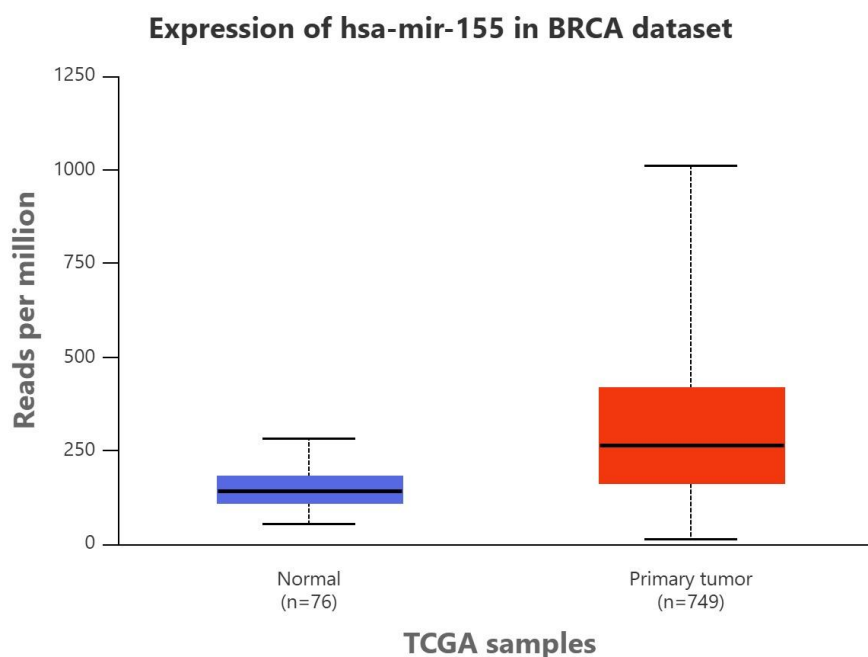


Рис. 5.8. Показники експресії hsa-miR-155 в умовно нормальній та злоякісно трансформованій тканині молочної залози за даними TCGA-BRCA (UALCAN).

Оцінка експресії hsa-miR-155 залежно від стадії пухлинного процесу засвідчила її достовірне підвищення при РМЗ I–III стадій порівняно з умовно нормальною тканиною молочної залози (рис. 5.9, А). Статистично значущу відмінність між окремими стадіями виявлено лише при порівнянні II та III стадій ($p=0,0021$). Для IV стадії достовірних відмінностей від нормальної тканини не встановлено, що може бути пов'язано з малою чисельністю групи ($n=8$).

Аналіз залежно від статусу регіонарних лімфатичних вузлів показав підвищення експресії hsa-miR-155 у групах N0–N3 порівняно з нормальною тканиною (рис. 5.9, Б). Найвищий медіанний показник зафіксовано при РМЗ категорії N2 — 353,12 RPM, тоді як при N3 він був достовірно нижчим порівняно з N0, N1 та N2. Отже, чіткої залежності експресії hsa-miR-155 від поширеності регіонарного лімфогенного метастазування не виявлено.

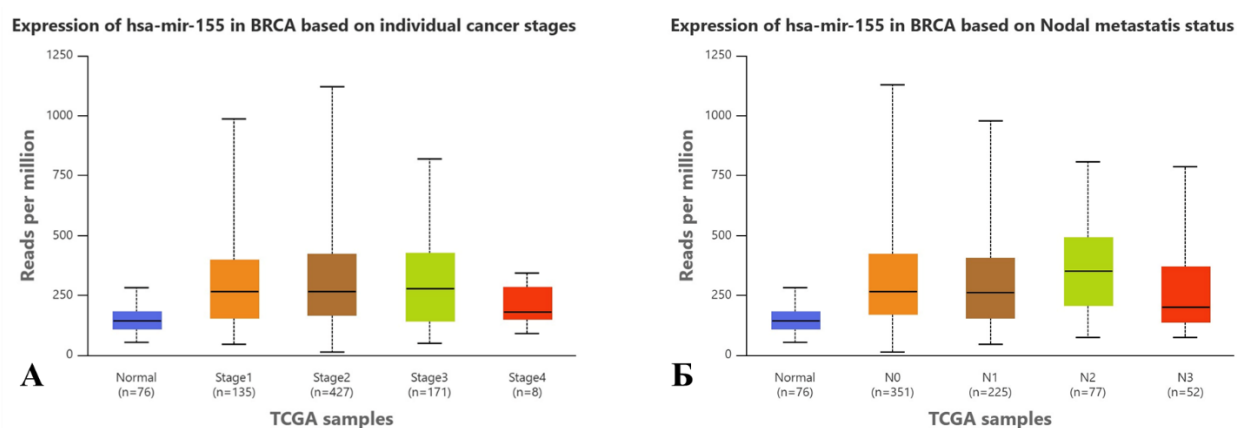


Рис. 5.9. Зв'язок показників експресії hsa-miR-155 у тканині РМЗ із стадією пухлинного процесу (А) та ступенем метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів за даними TCGA-BRCA (UALCAN)

Порівняння молекулярних підтипів РМЗ виявило поступове підвищення експресії hsa-miR-155 від люмінального до тричі-негативного підтипу (рис. 5.10, А). Медіанний рівень у люмінальних, HER2-позитивних і тричі-негативних пухлинах перевищував показник нормальної тканини відповідно у 1,74; 3,04 та 4,37 раза. Найвищу експресію встановлено при базальному РМЗ, де вона достовірно перевищувала показники люмінального ($p=2,05 \times 10^{-7}$) та HER2-позитивного підтипів ($p=0,032$).

Зіставлення гістологічних типів пухлин показало найбільш виражене підвищення експресії hsa-miR-155 при медулярній карциномі — у 11,63 раза порівняно з нормальною тканиною, однак цей результат слід оцінювати з урахуванням малої чисельності групи ($n=6$) (рис. 5.10, Б). Достовірне

підвищення також виявлено у зразках інвазивної протокової, інвазивної лобулярної та метаплатичної карцином. Рівень hsa-miR-155 при інвазивній протоковій карциномі був вищим, ніж при часточковій та муцинозній формах РМЗ.

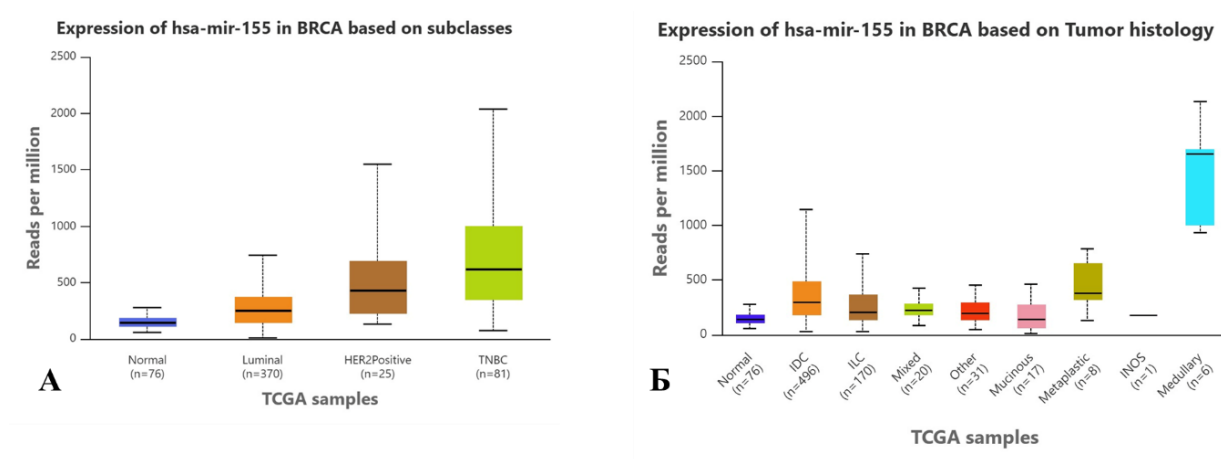


Рис. 5.10. Рівень експресії hsa-miR-155 у тканині раку молочної залози залежно від молекулярного підтипу (А) та гістологічного типу пухлини (Б) за даними TCGA-BRCA (UALCAN)

Як видно з даних, наведених на Рис. 5.11, медіанний рівень експресії hsa-miR-26a-1 у тканині РМЗ становив 1,99 RPM при коливаннях від 0 до 17,77 RPM, тоді як в умовно нормальній тканині молочної залози — 3,23 RPM при діапазоні 0,33–13,78 RPM. Незважаючи на зниження показника у пухлинній тканині приблизно у 1,62 раза, відмінність не була статистично значущою ($p=0,325$).

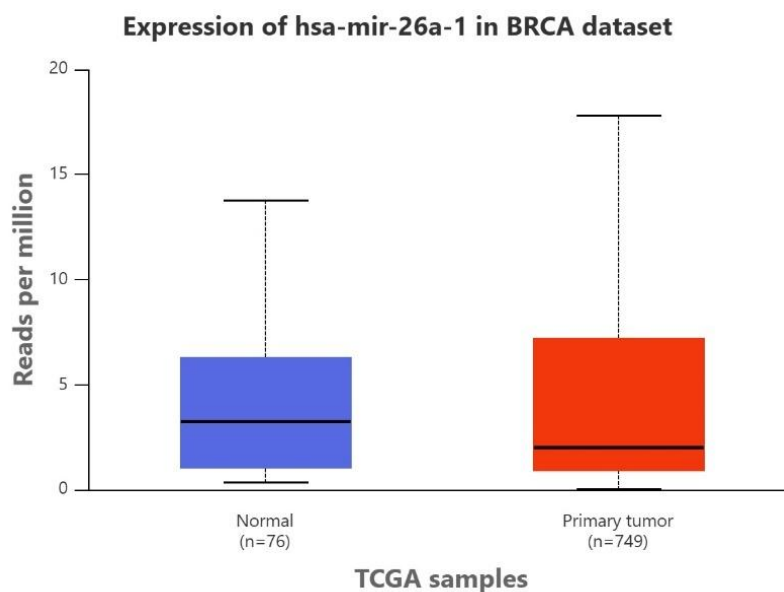


Рис. 5.11. Показники експресії hsa-mir-26a-1 в умовно нормальній та злоякісно трансформованій тканині молочної залози за даними TCGA-BRCA (UALCAN).

Оцінка експресії hsa-mir-26a-1 залежно від стадії пухлинного процесу не виявила достовірних відмінностей між нормальною тканиною та пухлинами I–III стадій (рис. 5.12, А). Водночас при IV стадії медіанний рівень становив 1,24 RPM і був приблизно у 2,60 раза нижчим, ніж у нормальній тканині ($p=0,0258$), а також достовірно меншим порівняно з I стадією ($p=0,0344$). Цей результат потребує обережної інтерпретації через малу чисельність групи IV стадії ($n=8$).

Зіставлення показників залежно від статусу регіонарних лімфатичних вузлів показало відсутність значущих відмінностей між нормальною тканиною та групами N0–N2 (рис. 5.12, Б). Натомість при РМЗ категорії N3 медіана експресії знижувалася до 1,08 RPM, що було приблизно у 3,0 раза менше за нормальну тканину ($p=0,0147$). Показник у групі N3 також був достовірно нижчим порівняно з N0 ($p=0,0399$), N1 ($p=0,0194$) та N2 новоутвореннями ($p=0,0103$).

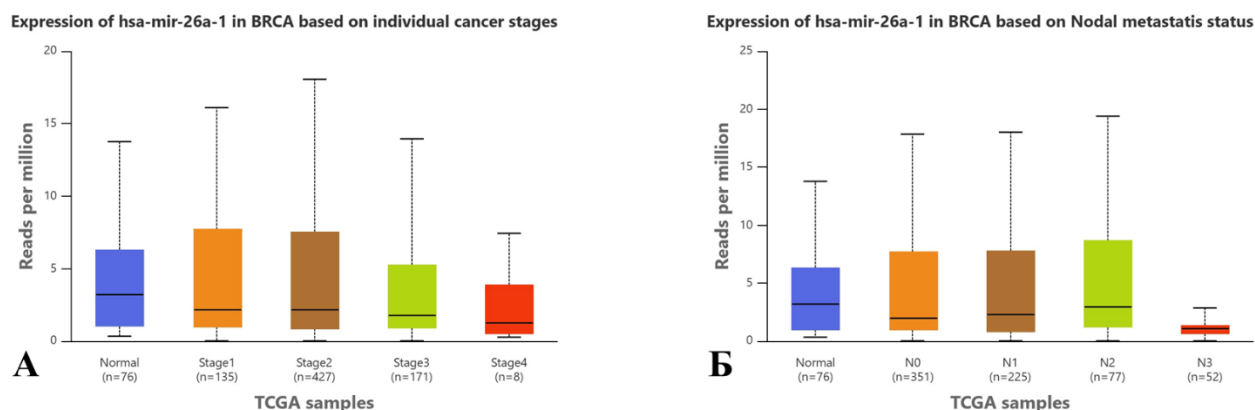


Рис. 5.12. Зв'язок показників експресії hsa-mir-26a-1 у тканині РМЗ зі стадією пухлинного процесу (А) та ступенем метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (Б) за даними TCGA-BRCA (UALCAN).

Порівняння молекулярних підтипів РМЗ не виявило статистично значущих відмінностей експресії hsa-mir-26a-1 ані відносно нормальної тканини, ані між люмінальним, HER2-позитивним і тричі-негативним підтипами (рис. 5.13, А). Найвищу медіану визначено у HER2/neu-позитивних пухлинах — 4,37 RPM, однак ця відмінність не досягала статистичної значущості.

Аналіз гістологічних типів показав вибіркове зниження експресії hsa-mir-26a-1 при інвазивній часточковій та метapластичній карциномах (рис. 5.13, Б). Порівняно з нормальною тканиною медіанний рівень був нижчим при інвазивній лобулярній карциномі — 1,08 RPM ($p=1,96 \times 10^{-4}$) та метapластичному РМЗ — 1,01 RPM ($p=5,61 \times 10^{-9}$). Експресія при інвазивній протоковій карциномі достовірно перевищувала відповідний показник при інвазивній лобулярній карциномі ($p=3,79 \times 10^{-11}$) та метapластичній карциномі ($p=1,88 \times 10^{-12}$). Відмінності також встановлено між інвазивною лобулярною карциномою та пухлинами змішаного й інших гістологічних типів, а також між метapластичною карциномою і пухлинами змішаного та інших гістологічних варіантів РМЗ.

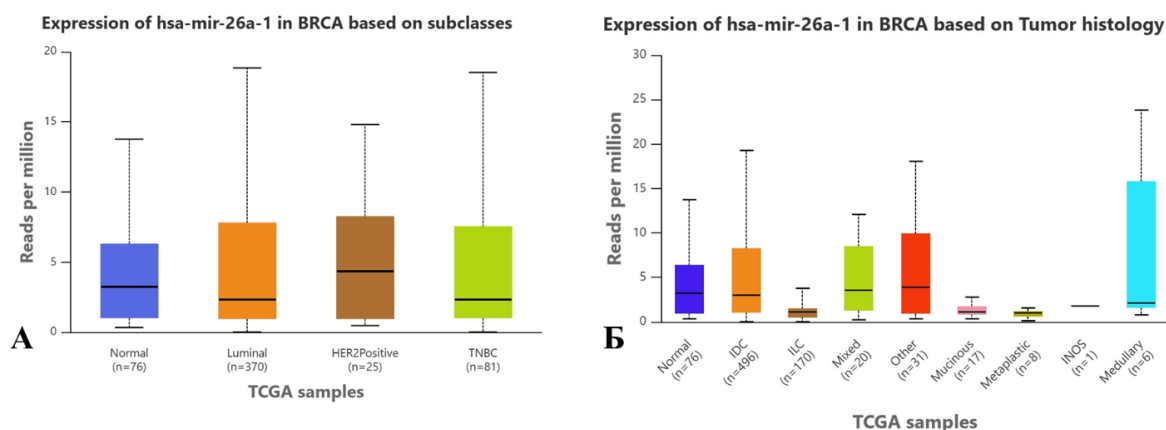


Рис. 5.13. Рівень експресії hsa-mir-26a-1 у тканині раку молочної залози залежно від молекулярного підтипу (А) та гістологічного типу пухлини (Б) за даними TCGA-BRCA (UALCAN)

За результатами аналізу, представленими на Рис. 5.14, медіанний рівень експресії hsa-mir-18a у тканині первинного РМЗ становив 5,54 RPM і був у 1,68 раза вищим порівняно з умовно нормальною тканиною молочної залози, де цей показник дорівнював 3,31 RPM. Відмінності між групами були статистично значущими ($p=1,20 \times 10^{-12}$), при цьому пухлинні зразки характеризувалися ширшим діапазоном індивідуальних значень експресії.

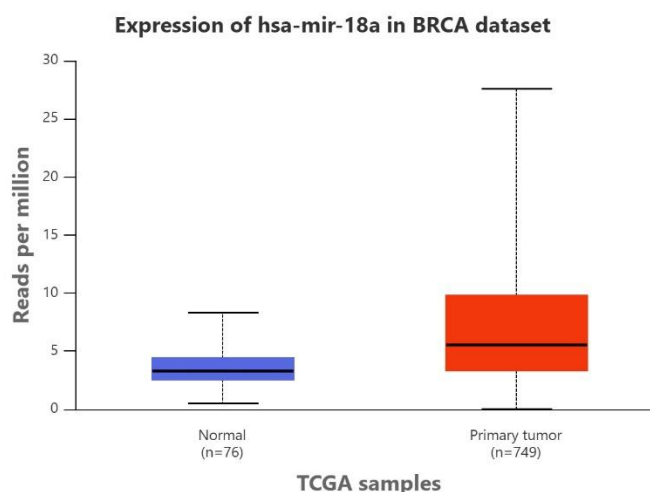


Рис. 5.14. Показники експресії hsa-mir-18a в умовно нормальній та злоякісно трансформованій тканині молочної залози за даними TCGA-BRCA (UALCAN)

Оцінка експресії hsa-mir-18a залежно від стадії пухлинного процесу засвідчила її достовірне підвищення при РМЗ усіх стадій порівняно з умовно нормальною тканиною (рис. 5.15, А). Медіанні показники при I–IV стадіях перевищували контрольний рівень відповідно у 1,62; 1,78; 1,51 та 3,49 рази. Найвище значення зареєстровано при IV стадії — 11,55 RPM. Між окремими стадіями статистично значущі відмінності встановлено для порівнянь I та II ($p=0,0048$), а також II та III стадій ($p=0,0025$); послідовної стадійно-залежної зміни експресії не виявлено.

Аналіз залежно від стану регіонарних лімфатичних вузлів показав достовірне підвищення експресії hsa-mir-18a у групах N0–N2 порівняно з нормальною тканиною (рис. 5.15, Б). Найвищу медіану виявлено за відсутності метастатичного ураження лімфатичних вузлів — 6,34 RPM. У групі хворих категорії N3 показник знижувався до 4,12 RPM і не відрізнявся від нормальної тканини. Експресія при N3 була достовірно меншою порівняно з N0 ($p=1,61 \times 10^{-7}$), N1 ($p=0,019$) та N2 ($p=0,0016$), що не дозволяє говорити про її послідовне підвищення зі зростанням ступеня ураження регіонарних лімфатичних вузлів.

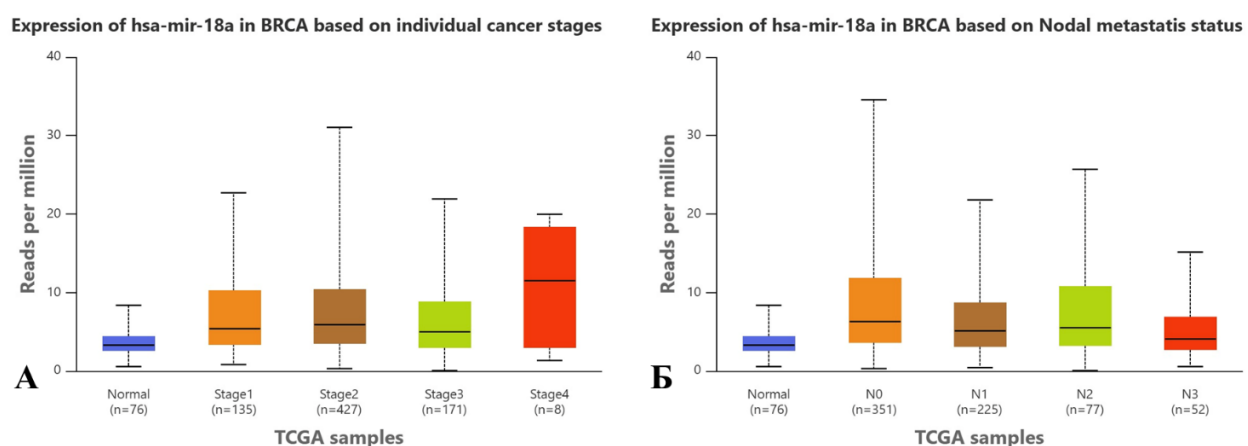


Рис. 5.15. Зв'язок показників експресії hsa-mir-18a у тканині РМЗ зі стадією пухлинного процесу (А) та ступенем метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (Б) за даними TCGA-BRCA (UALCAN)

Порівняння молекулярних підтипів РМЗ виявило найбільш виражене підвищення експресії hsa-mir-18a у тричі-негативних пухлинах (рис. 5.16, А). Медіанні показники у люмінальному, HER2/neu-позитивному та тричі-негативному підтипах перевищували рівень нормальної тканини відповідно у 1,45; 2,47 та 8,23 раза. Найвищу експресію встановлено при тричі-негативному РМЗ — 27,25 RPM, що достовірно перевищувало показники люмінального ($p=3,87 \times 10^{-10}$) та HER2/neu-позитивного підтипів ($p=0,0105$). Відмінність між люмінальними та HER2-позитивними пухлинами також була статистично значущою ($p=0,0385$).

Зіставлення гістологічних типів пухлин показало найвищий рівень експресії hsa-mir-18a при медулярній карциномі — 49,17 RPM, що у 14,86 раза перевищувало показник нормальної тканини ($p=0,0059$; рис. 5.16, Б). Достовірне підвищення порівняно з нормальною тканиною також встановлено при інвазивній протоковій карциномі — у 1,95 раза ($p=2,15 \times 10^{-14}$). При метapластичному РМЗ медіана становила 10,05 RPM, однак відмінність не досягала статистичної значущості. Експресія при інвазивній протоковій карциномі достовірно перевищувала показники часточкової, змішаної, муцинозної та інших гістологічних форм.

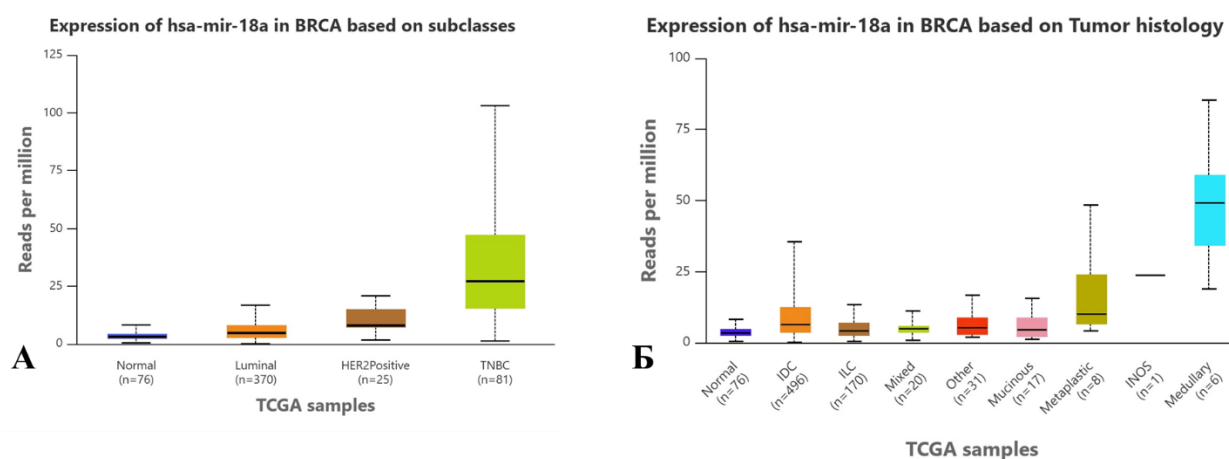


Рис. 5.16. Рівень експресії hsa-mir-18a у тканині раку молочної залози залежно від молекулярного підтипу (А) та гістологічного типу пухлини (Б) за даними TCGA-BRCA (UALCAN)

Слід зазначити, що у базі UALCAN відсутні окремі профілі експресії зрілих форм hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-155-5p та hsa-miR-18a-5p, для біоінформатичного аналізу використано доступні показники їхніх попередників — hsa-mir-26a-1, hsa-mir-155 та hsa-mir-18a відповідно. Отримані дані розглядали як опосередковану характеристику експресії досліджуваних мікроРНК та інтерпретували з урахуванням того, що рівень попередника не обов'язково повністю відображає вміст його зрілої 5p-форми.

З огляду на отримані біоінформатичні дані, наступним етапом роботи став аналіз результатів власних досліджень щодо взаємозв'язків між рівнями експресії пухлино-асоційованих мікроРНК та основними клініко-патологічними характеристиками РМЗ. З цією метою досліджено особливості експресії мікроРНК-26a-5p, мікроРНК-155-5p та мікроРНК-18a-5p залежно від розміру первинної пухлини, статусу регіонарних лімфатичних вузлів, ступеня гістологічного диференціювання, гістологічного та молекулярного підтипів пухлини, а також експресії гормональних рецепторів і рівня проліферативної активності РМЗ.

Для оцінки взаємозв'язку між рівнями експресії досліджуваних мікроРНК та розміром первинної пухлини проведено порівняльний аналіз їх експресії у хворих із пухлинами категорій T1 та T2, який показав відсутність статистично значущих відмінностей рівнів експресії мікроРНК-26a-5p, мікроРНК-155-5p та мікроРНК-18a-5p залежно від категорії T ($p=0,729$, $p=0,588$ та $p=0,332$ відповідно) (рис. 5.17).

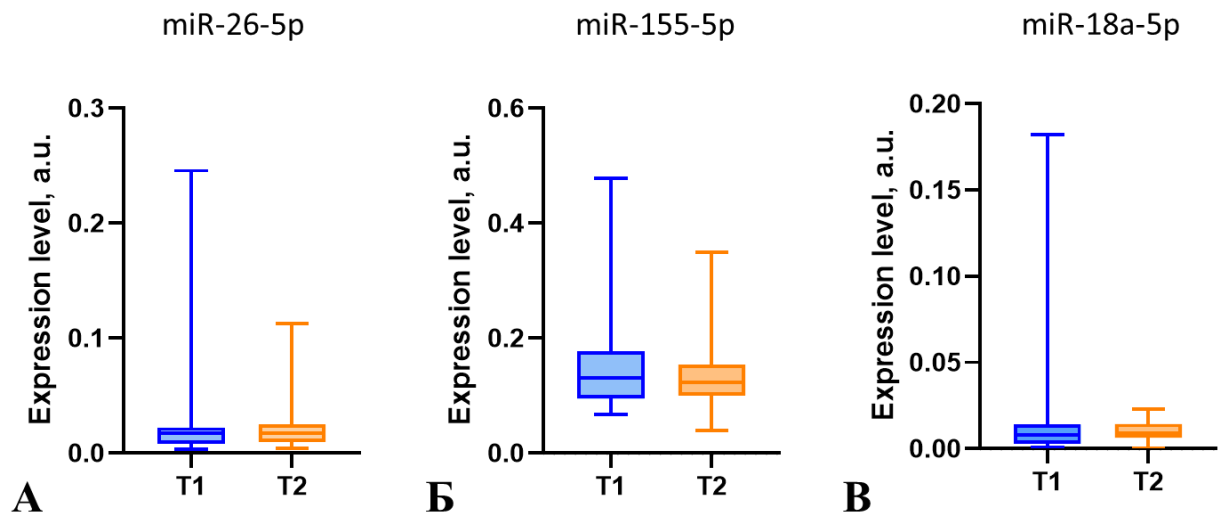


Рис. 5.17. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26а-5р (А), мікроРНК-155-5р (Б) та мікроРНК-18а-5р (В) з розміром первинної пухлини.

Порівняльний аналіз рівнів експресії досліджуваних мікроРНК у групах N0 та N1 показав, що у хворих на РМЗ із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів (N1) рівень експресії мікроРНК-26а-5р був у 1,29 раза вищим порівняно з хворими групи N0 ($p=0,0292$), тоді як рівень експресії мікроРНК-155-5р був у 1,22 раза нижчим ($p=0,0321$). Статистично значущих відмінностей рівня експресії мікроРНК-18а-5р залежно від статусу регіонарних лімфатичних вузлів не встановлено ($p=0,4257$) (Рис. 5.18).

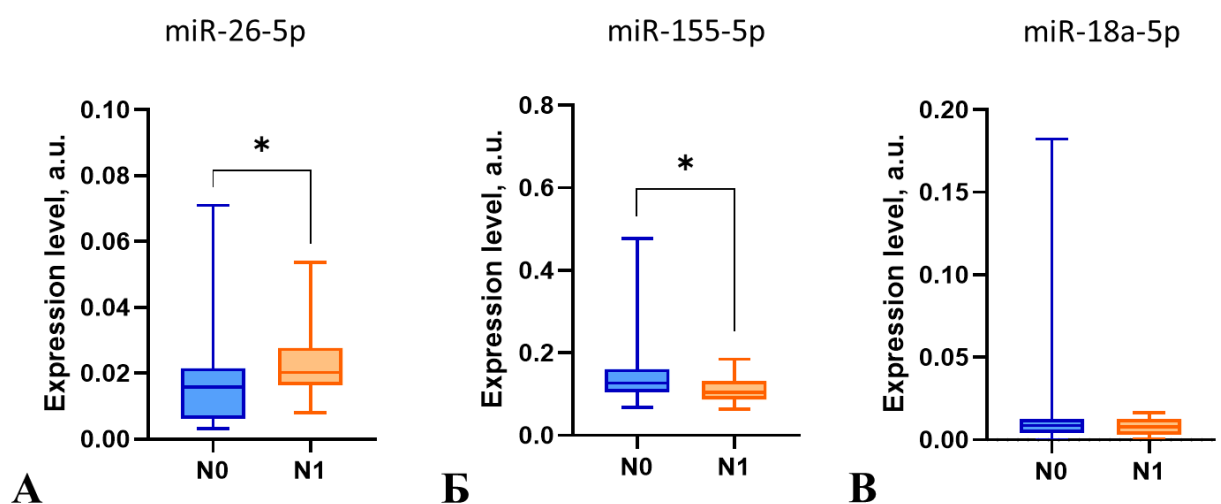


Рис. 5.18. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26а-5р (А), мікроРНК-155-5р (Б) та мікроРНК-18а-5р (В) зі статусом регіонарних лімфатичних вузлів у хворих на РМЗ

Статистично значущих відмінностей експресії мікроРНК-26а-5р, мікроРНК-155-5р та мікроРНК-18а-5р у пухлинній тканині залежно від її стадії РМЗ не встановлено ($p = 0,512$, $p = 0,524$ та $p = 0,400$ відповідно) (рис. 5.19).

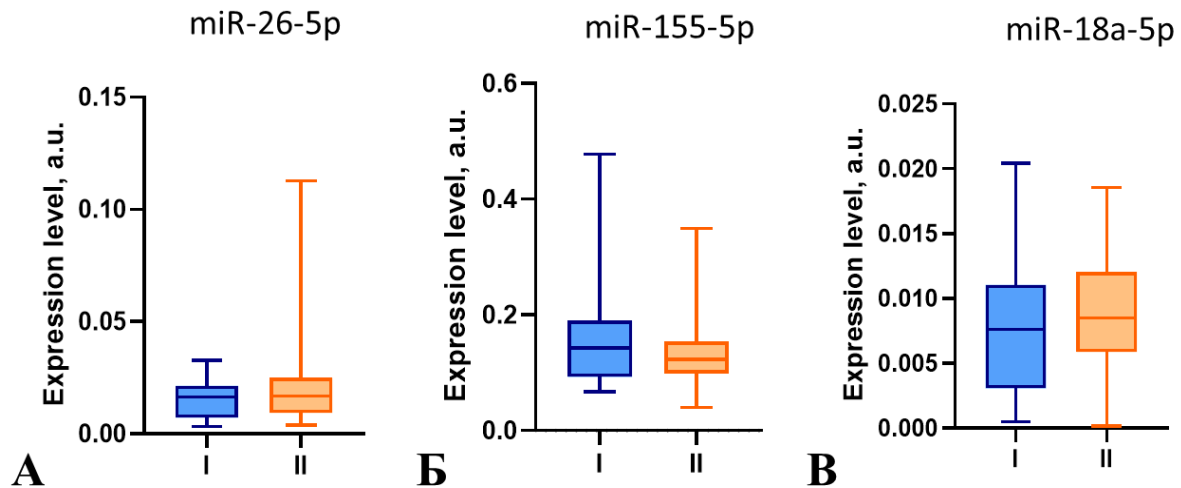


Рис. 5.19. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26а-5р (А), мікроРНК-155-5р (Б) та мікроРНК-18а-5р (В) зі стадією РМЗ

Оцінка взаємозв'язку між рівнями експресії досліджуваних мікроРНК та ступенем диференціювання пухлини показала, що статистично значущих відмінностей рівнів експресії мікроРНК-26а-5р, мікроРНК-155-5р та мікроРНК-18а-5р залежно від категорії G не виявлено ($p = 0,796$, $p = 0,861$ та $p = 0,389$ відповідно) (рис. 5.20).

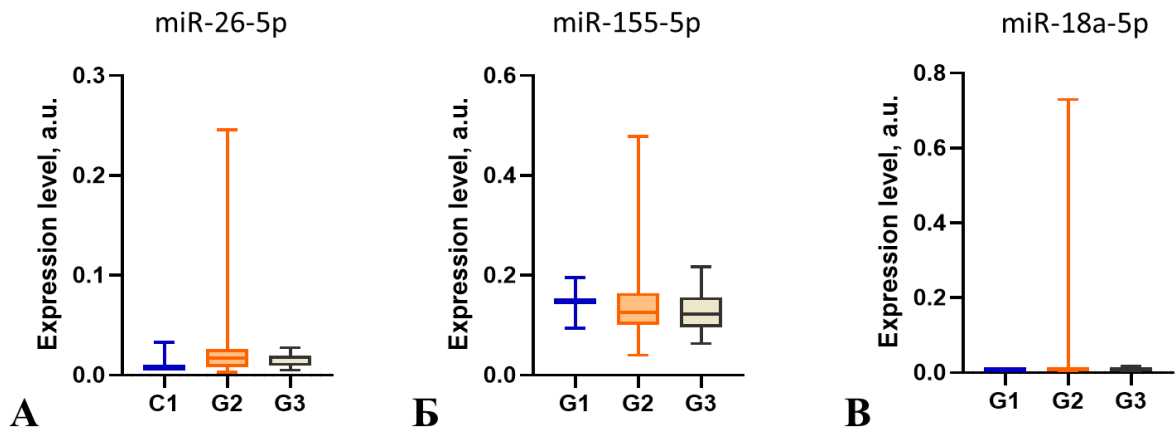


Рис. 5.20. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26а-5р (А), мікроРНК-155-5р (Б) та мікроРНК-18а-5р (В) зі ступенем диференціювання пухлини у хворих на РМЗ

При дослідженні рівнів експресії досліджуваних мікроРНК у тканини різних молекулярних підтипів РМЗ встановлено наявність статистично значущої загальної різниці рівнів експресії лише для мікроРНК-155-5р ($p=0,032$), тоді як для мікроРНК-26а-5р та мікроРНК-18а-5р достовірних відмінностей не виявлено ($p=0,872$ та $p=0,827$ відповідно) (рис. 5.21). За результатами множинних порівнянь (Dunn's multiple comparisons test) статистично значущих відмінностей між окремими молекулярними підтипами не встановлено ($p>0,05$).

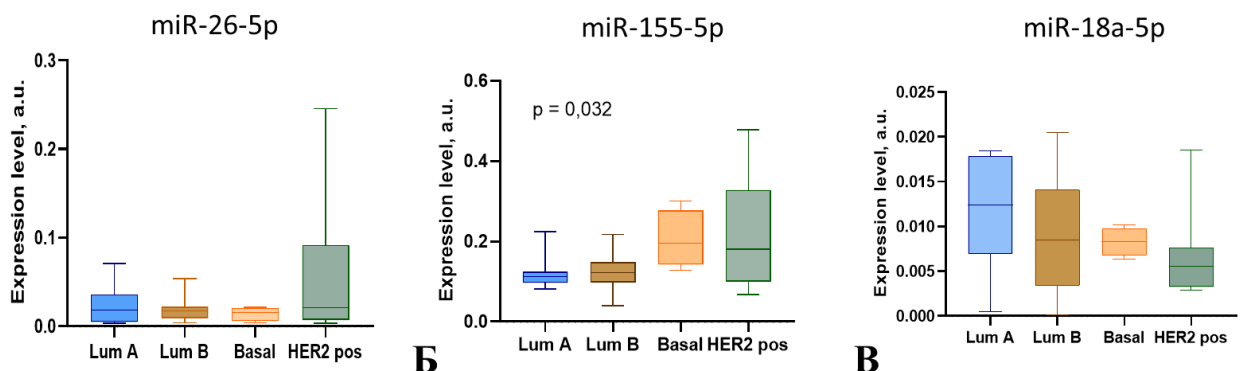


Рис. 5.21. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26а-5р (А), мікроРНК-155-5р (Б) та мікроРНК-18а-5р (В) з молекулярним підтипом РМЗ

Серед досліджуваних мікроРНК статистично значущі відмінності залежно від гістологічного типу РМЗ виявлено лише для мікроРНК-18а-5р. Її експресія у пухлинній тканині протокової карциноми була у 2,03 раза вищою порівняно з пухлинною тканиною лобулярної карциноми ($p=0,038$). Для мікроРНК-26а-5р та мікроРНК-155-5р достовірних відмінностей не встановлено ($p=0,286$ та $p=0,935$ відповідно) (рис. 5.22).

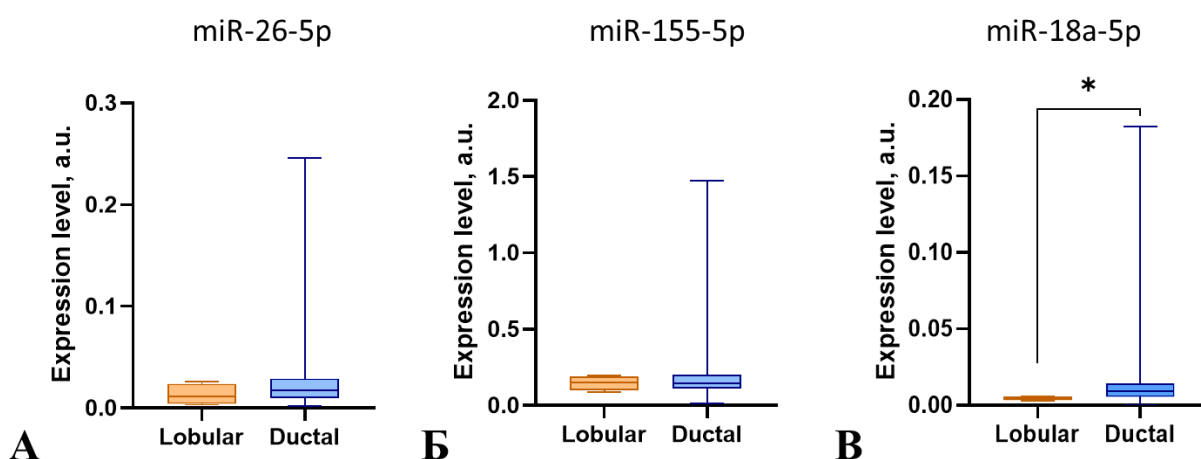


Рис. 5.22. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26а-5р (А), мікроРНК-155-5р (Б) та мікроРНК-18а-5р (В) з гістологічним типом РМЗ

Аналіз експресії досліджуваних мікроРНК у пухлинній тканині залежно від рецепторного статусу РМЗ не виявив статистично значущих відмінностей для ER та PR. Водночас у HER2/неу-позитивних пухлинах експресія мікроРНК-26а-5р була у 6,4 раза вищою порівняно з HER2-негативними пухлинами ($p=0,003$). Для мікроРНК-155-5р та мікроРНК-18а-5р статистично значущих відмінностей залежно від HER2-статусу не встановлено ($p=0,244$ та $p=0,266$ відповідно) (рис. 5.23).

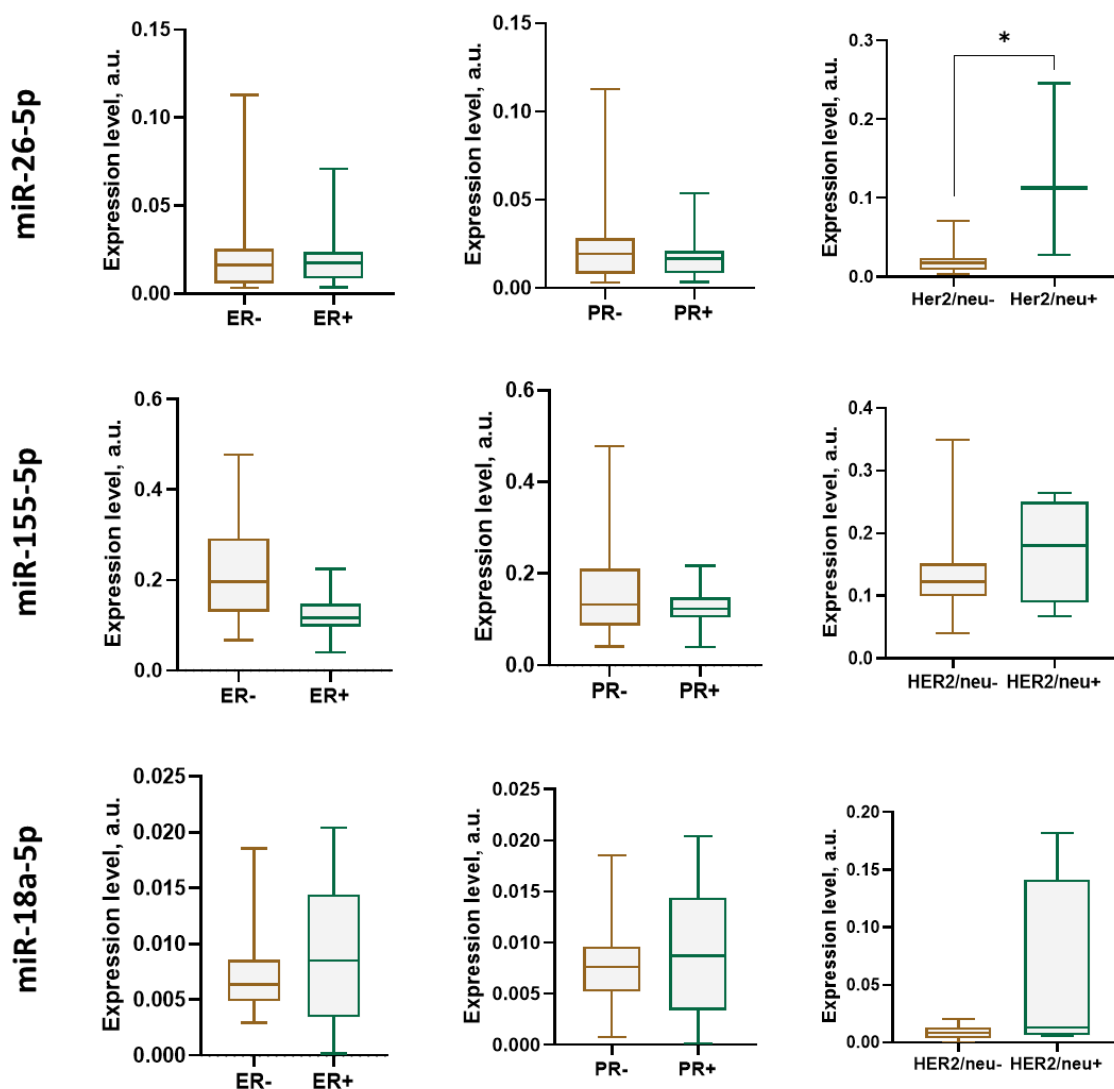


Рис. 5.23. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26а-5р, мікроРНК-155-5р та мікроРНК-18а-5р з рецепторним статусом РМЗ

Оцінка залежності експресії досліджуваних мікроРНК у пухлинній тканині від рівня експресії маркера проліферації Ki-67 показала, що у пухлинах із високою проліферативною активністю (Ki-67 >14%) експресія мікроРНК-26а-5р була у 1,27 раза вищою порівняно з пухлинами з низьким рівнем експресії Ki-67 (<14%) ($p=0,0404$). Для мікроРНК-155-5р та мікроРНК-18а-5р статистично значущих відмінностей залежно від рівня експресії Ki-67 не встановлено (рис. 5.24).

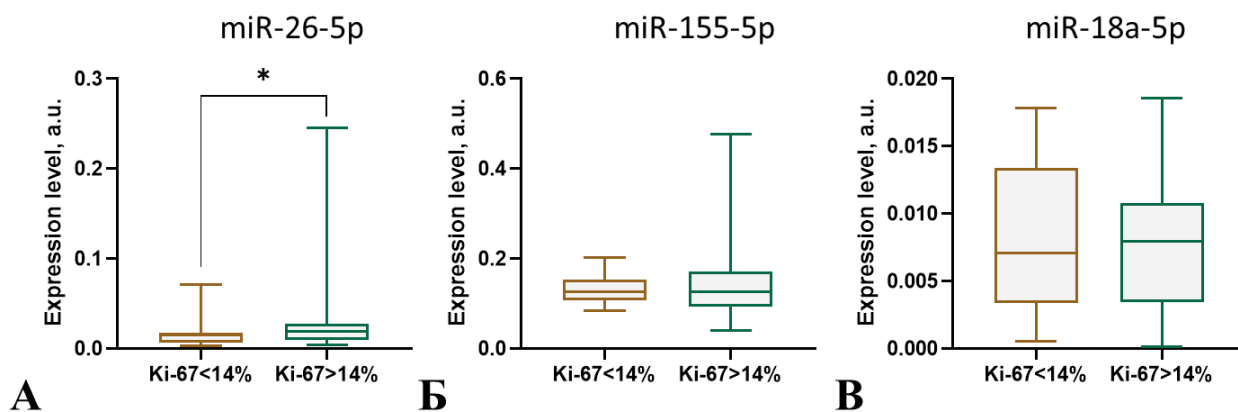


Рис. 5.24. Зв'язок показників експресії мікроРНК-26а-5р (А), мікроРНК-155-5р (Б) та мікроРНК-18а-5р (В) з проліферати РМЗ

Таким чином, аналіз взаємозв'язків між рівнями експресії пухлино-асоційованих мікроРНК та клініко-патологічними характеристиками РМЗ продемонстрував, що профіль досліджуваних мікроРНК відображає окремі параметри пухлинного росту та метастазування.. Зокрема, підвищення експресії мікроРНК-26а-5р було пов'язане з наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів, HER2/neu-статусом та проліферативною активністю пухлини, тоді як експресія мікроРНК-155-5р була меншою у хворих із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів. Крім того, встановлено підвищення експресії мікроРНК-18а-5р у пухлинній тканині протокової карциноми порівняно з лобулярною карциномою. Для більшості інших клініко-патологічних характеристик, зокрема розміру первинної пухлини, клінічної стадії, ступеня гістологічного диференціювання, рецепторного статусу ER і PR, статистично значущих відмінностей експресії досліджуваних мікроРНК не встановлено. Водночас для мікроРНК-155-5р виявлено статистично значущу загальну залежність від молекулярного підтипу РМЗ, проте за результатами множинних порівнянь достовірних відмінностей між окремими молекулярними підтипами не виявлено.

Отримані результати свідчать, що мікроРНК-26а-5р, мікроРНК-155-5р та мікроРНК-18а-5р асоційовані з окремими клініко-патологічними

характеристиками, які відображають біологічну агресивність РМЗ, що обґрунтовує доцільність подальшої оцінки їх потенційного прогностичного значення.

Результати проведених досліджень в розділі 5, опубліковано у [122, 125, 126, 128, 130]

РОЗДІЛ 6. ЗНАЧЕННЯ МАТРИЦЕЛЮЛЯРНИХ ГЕНІВ У РЕГУЛЯЦІЇ СТРОМАЛЬНО-ІМУННОГО МІКРООТОЧЕННЯ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

6.1. Дослідження особливостей експресії *SPP1/SPARC* і *OPN/ON* у тканині раку молочної залози в системі *in silico*

З метою визначення особливостей експресії генів *SPP1* та *SPARC*, що кодують відповідно *OPN* та *ON*, а також оцінки їх клініко-прогностичного значення при РМЗ проведено комплексний аналіз відкритих біоінформатичних ресурсів. Аналіз охоплював тканинну специфічність експресії на рівні мРНК і білка, порівняння пухлинної та немалігнізованої тканини молочної залози, зв'язок із стадією і стадійною підгрупою захворювання, а також показниками загальної виживаності пацієнтів.

У дослідженні використано інформаційні ресурси The Human Protein Atlas (HPA) для оцінки експресії *OPN* і *ON* у нормальних та пухлинних тканинах на рівні білка, а також панканцерного профілю експресії мРНК *SPP1* і *SPARC*; GEPIA3 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis 3) — для порівняння рівнів експресії генів у пухлинній і немалігнізованій тканині та аналізу їх експресії залежно від клінічної стадії й підстадії РМЗ; The Cancer Genome Atlas (TCGA) — як джерело транскриптомних і клінічних даних зразків злоякісних новоутворень, зокрема для аналізу загальної виживаності хворих на РМЗ; Genotype-Tissue Expression (GTEx) — як джерело даних щодо експресії генів у нормальних тканинах, інтегрованих із даними TCGA у вебресурсі GEPIA3. За даними The Human Protein Atlas, найбільш виражену експресію *OPN* на рівні білка виявлено у тканинах нирки та жовчного міхура. Висока експресія *ON* була характерною для тканин головного мозку, нирки, яєчка, плаценти та надниркової залози (рис. 6.1).

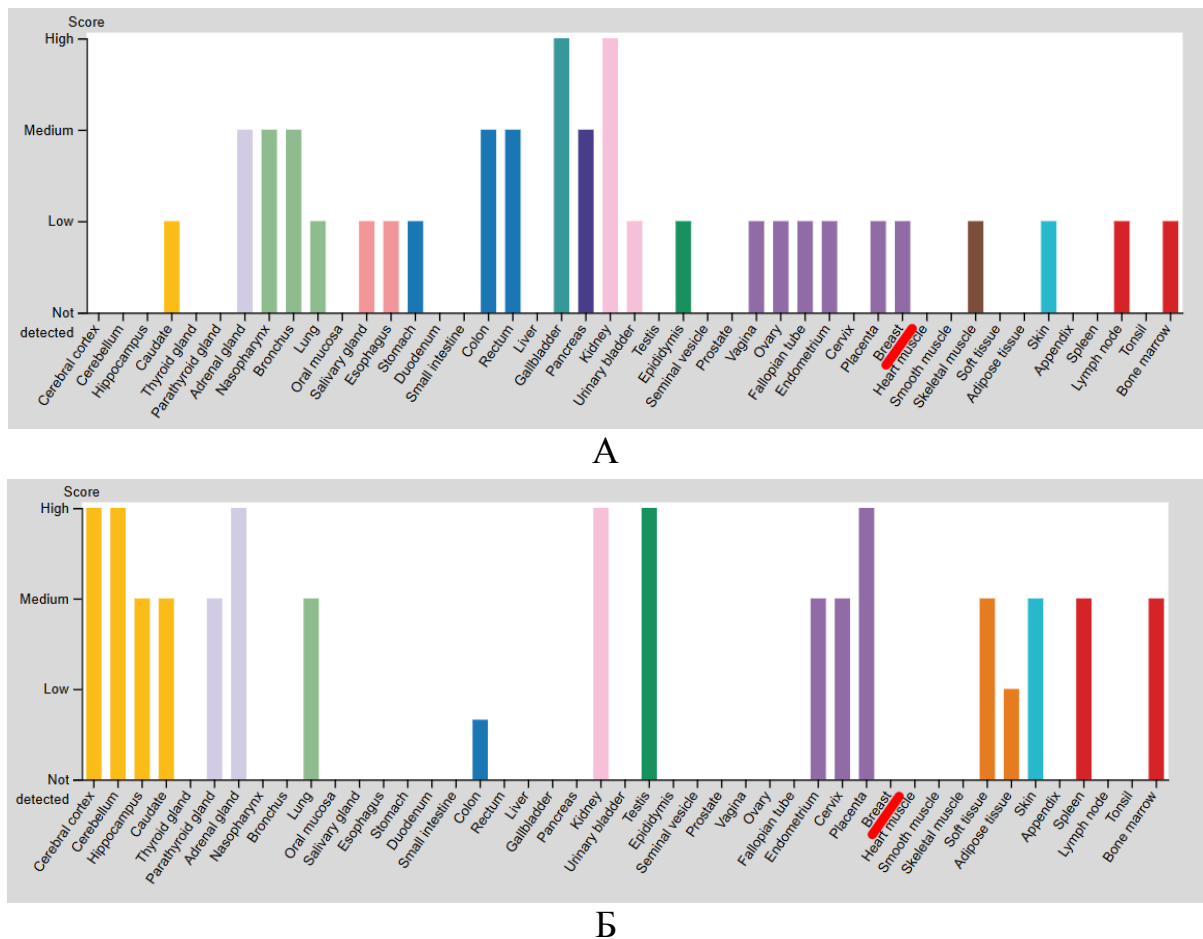
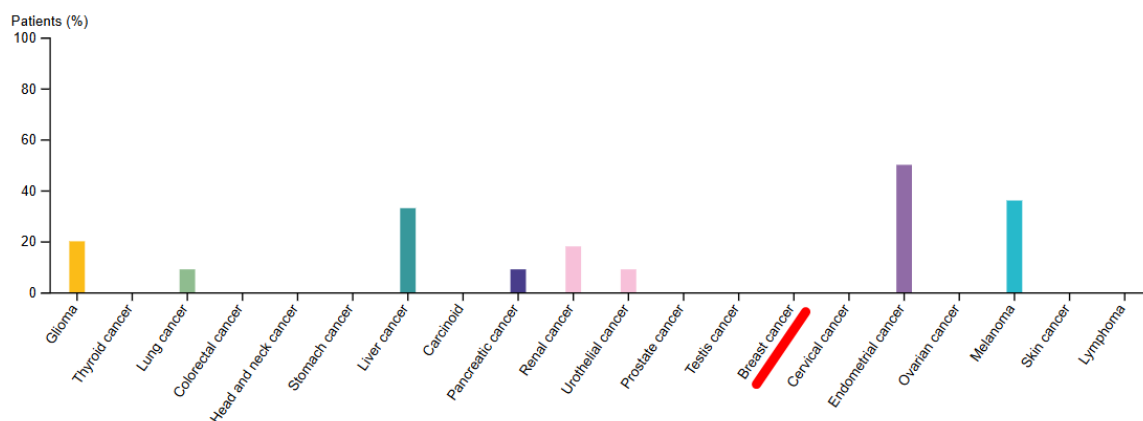
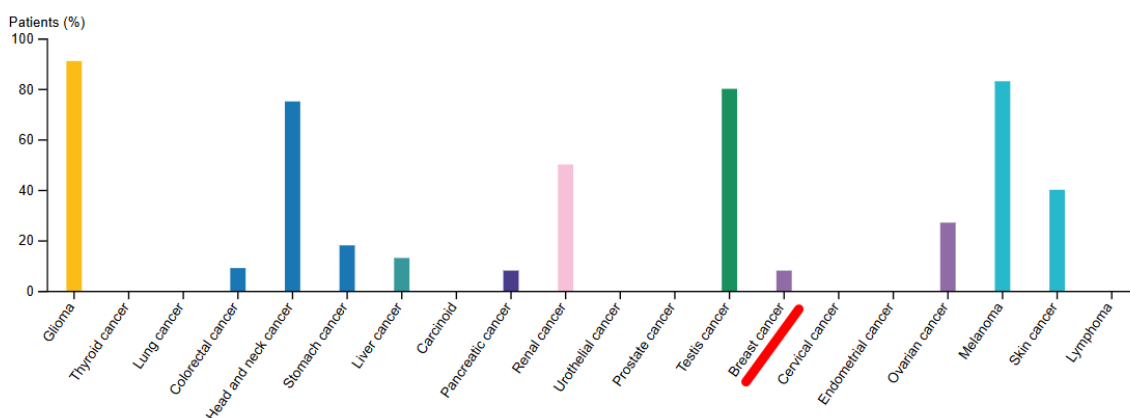


Рис. 6.1. Профіль експресії OPN (А) та ON (Б) на рівні білка у нормальних тканинах організму *Homo sapiens*. Джерело: The Human Protein Atlas

За результатами ІГХ аналізу The Human Protein Atlas із застосуванням антитіла HPA027541 високої експресії OPN у тканині РМЗ не виявлено. Для оцінки експресії ON використано три валідовані антитіла — HPA002989, HPA003020 та SAB002306. Залежно від використаного антитіла позитивне імуногістохімічне забарвлення визначали у 8–17 % зразків РМЗ. Оскільки результати, отримані із застосуванням усіх трьох антитіл, мали подібну спрямованість, на Рис. 6.2 наведено репрезентативні дані.



А



Б

Рис. 6.2. Експресія OPN (А) та ON (Б) на рівні білка у тканинах злоякісних новоутворень різної локалізації. Джерело: The Human Protein Atlas

Аналіз транскриптомних даних TCGA, представлених у The Human Protein Atlas, показав, що медіанний рівень експресії *SPP1* у тканині інвазивної карциноми молочної залози становив 149,2 pTPM (protein-coding transcripts per million), тоді як для *SPARC* цей показник дорівнював 1314,7 pTPM (рис. 6.3). Для *SPP1* була характерна відносно висока експресія у тканині РМЗ порівняно з більшістю інших типів злоякісних новоутворень. Водночас *SPARC* мав низьку пухлинну специфічність і експресувався у пухлинах різного гістогенезу.

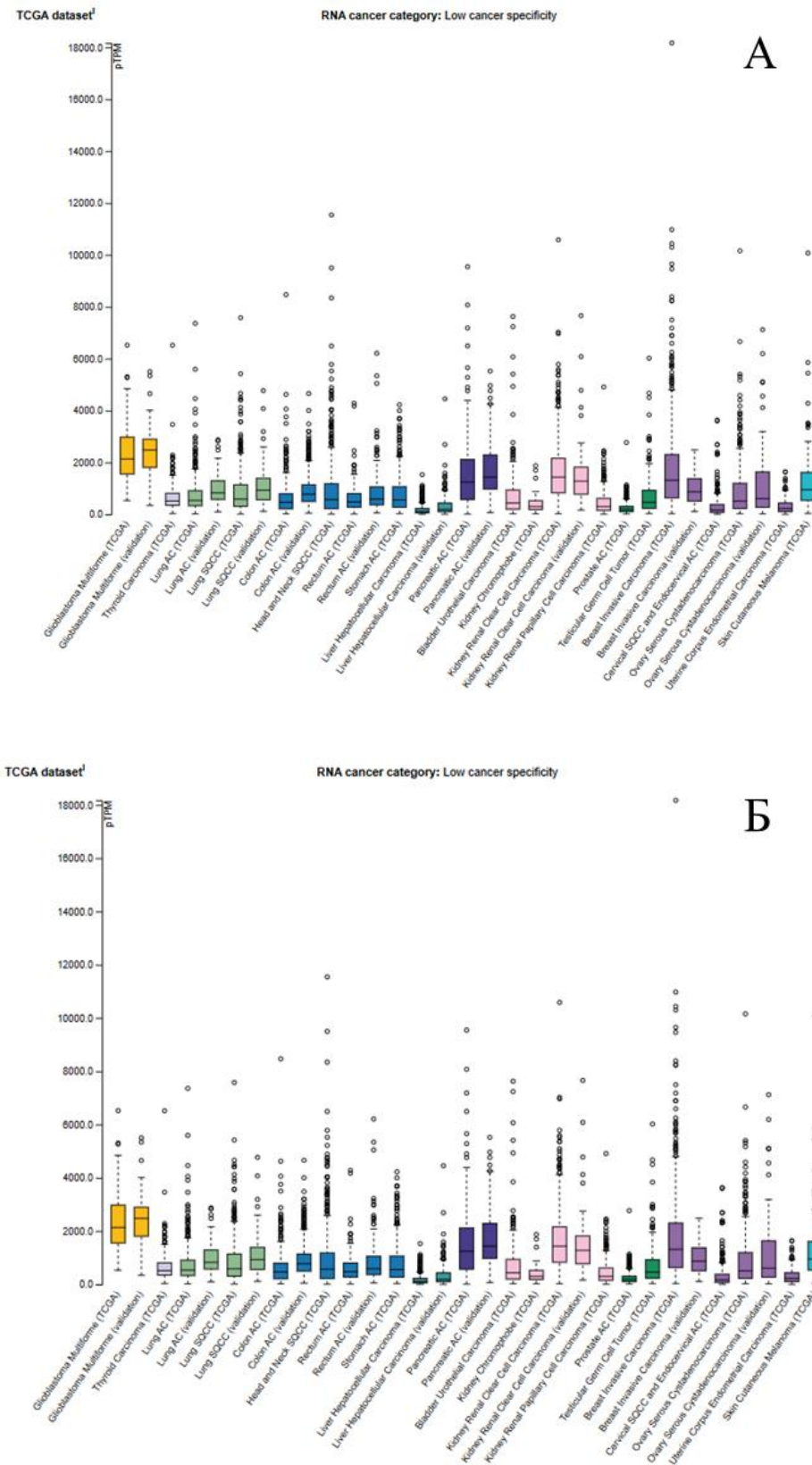


Рис. 6.3. Розподіл експресії мРНК генів *SPP1* (А) та *SPARC* (Б) у злоякісних новоутвореннях різного гістогенезу. Джерело: The Human Protein Atlas; дані TCGA

Панканцерний аналіз у GEPIA3 підтвердив, що обидва гени експресуються у широкому спектрі злоякісних новоутворень. Найвищі рівні експресії *SPARC* виявлено при мультиформній гліобластомі (GBM), гліомі головного мозку низького ступеня злоякісності (LGG) та саркомі (SARC). Для *SPP1* найвищі показники були характерними для папілярно-клітинного раку нирки (KIRP), мультиформної гліобластоми (GBM) та мезотеліоми (MESO) (рис. 6.4).

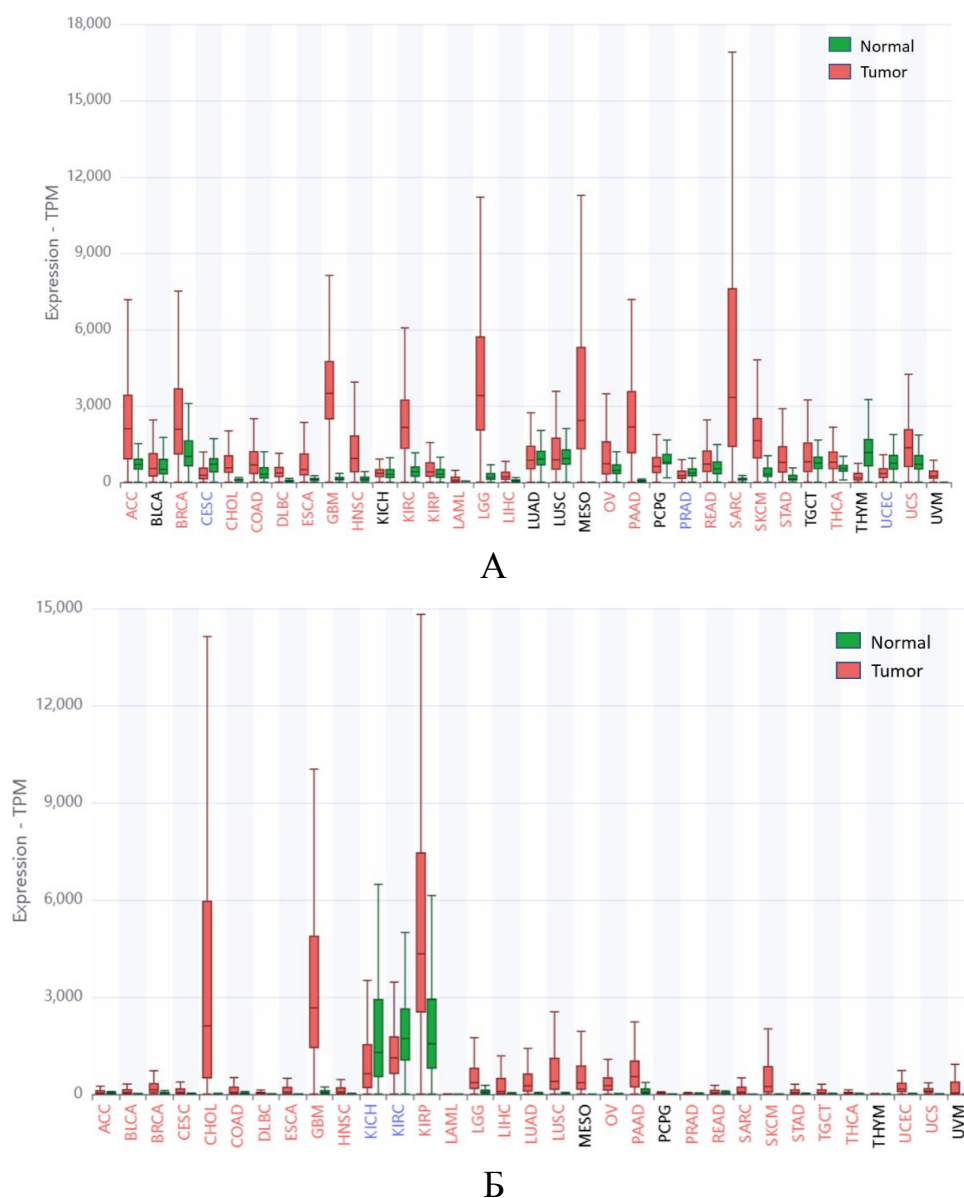
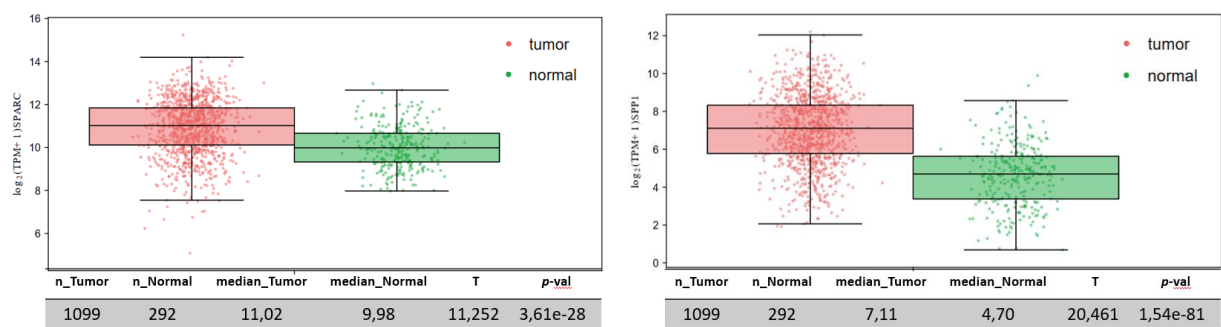


Рис. 6.4. Панканцерний профіль експресії *SPARC* (А) і *SPP1* (Б) у нормальній та пухлинній тканині різної локалізації.

Джерело: GEPIA3; дані TCGA та GTEx.

У вибірці GEPIA3, що включала 1099 зразків РМЗ і 292 зразки немалігнізованої тканини молочної залози, рівні експресії обох генів були статистично значуще вищими у пухлинній тканині (рис. 6.5). Медіана експресії *SPARC* становила 11,02 проти 9,98 $\log_2$ (TPM+1) у нормальній тканині ($p = 3,61 \times 10^{-28}$), що відповідало приблизно двократному підвищенню у вихідній шкалі TPM (2078,46 проти 1011,18 TPM). Для *SPP1* медіанні значення дорівнювали відповідно 7,11 і 4,70 $\log_2$ (TPM+1) ($p = 1,54 \times 10^{-81}$), що відповідало підвищенню більш ніж у 5 разів (137,06 проти 24,92 TPM). Отже, *SPP1* характеризувався більш вираженим відносним підвищенням експресії, тоді як *SPARC* мав вищий абсолютний рівень транскрипції.



А

Б

Рис. 6.5. Порівняння експресії *SPARC* (А) і *SPP1* (Б) у тканині РМЗ та немалігнізованій тканині молочної залози. Джерело: GEPIA3; дані TCGA та GTEx.

Зіставлення рівнів експресії *SPARC* та *SPP1* на різних клінічних стадіях РМЗ (I–IV) не виявило статистично значущих відмінностей. Показники обох маркерів залишалися відносно стабільними незалежно від етапу захворювання, що підтверджується отриманими значеннями критерію значущості: ($p = 0,405$) для *SPARC* (рис. 6.6, А) та ($p = 0,350$) для *SPP1* (рис. 6.6, Б). Таким чином, у загальному розподілі за стадіями експресія досліджуваних генів не демонструвала послідовної залежності від ступеня поширеності пухлинного процесу.

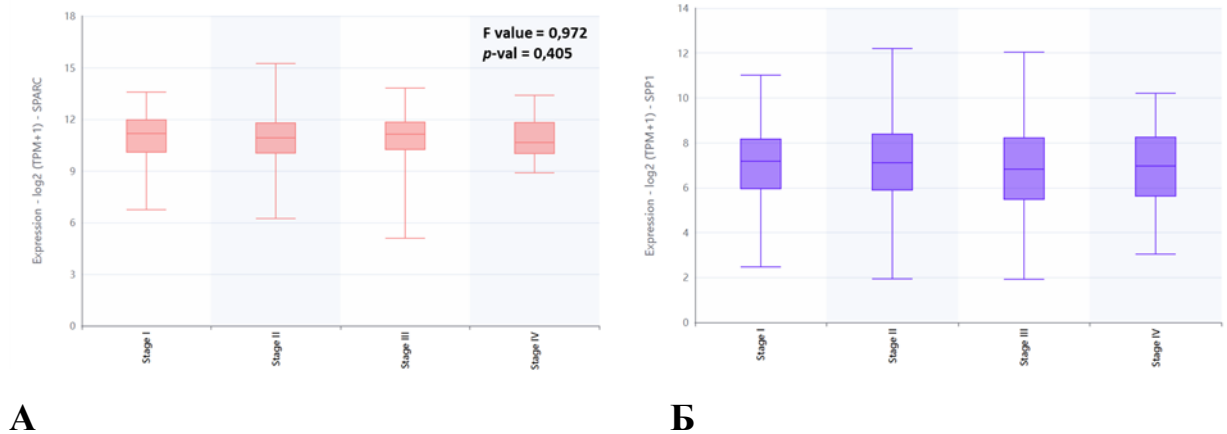


Рис. 6.6. Рівень експресії *SPARC* (А) та *SPP1* (Б) залежно від стадії РМЗ. Джерело: GEPIA3; дані TCGA.

Більш детальна стратифікація за клінічними підкатегоріями також не виявила статистично значущих відмінностей експресії *SPARC* ($p = 0,500$). Натомість рівень експресії *SPP1* варіював залежно від підкатегорії РМЗ (загальний міжгруповий ($p = 0,0447$); при цьому найвищі медіанні значення спостерігали у межах підкатегорій IIIA–IIIV (рис. 6.7). Оскільки наведений аналіз відображає загальну міжгрупову різницю, інтерпретація окремих парних відмінностей потребує результатів відповідного пост-хок порівняння.

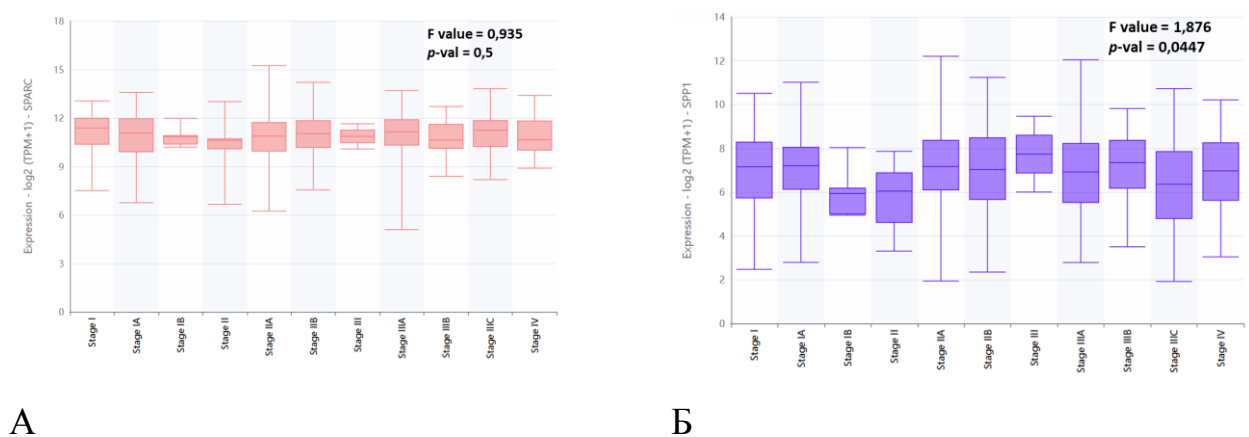


Рис. 6.7. Рівень експресії *SPARC* (А) та *SPP1* (Б) залежно від підкатегорії стадіювання РМЗ. Джерело: GEPIA3; дані TCGA.

Для оцінки прогностичного значення досліджуваних генів проведено аналіз загальної виживаності хворих на основі даних TCGA. Для кожного гена пацієнток розподілено на групи з низьким і високим рівнем експресії по 545 осіб у кожній групі (рис. 6.8). Для *SPARC* медіана загальної виживаності становила 140,19 міс. у групі низької експресії та 113,74 міс. у групі високої експресії; відношення ризиків дорівнювало 1,26 (95 % ДІ 0,91–1,73; $p = 0,162$). Для *SPP1* відповідні медіани становили 129,61 і 127,24 міс., а відношення ризиків — 1,20 (95 % ДІ 0,87–1,65; $p = 0,269$). Отже, у загальній когорті TCGA відмінності виживаності між групами з високою та низькою експресією *SPP1* або *SPARC* не досягали статистичної значущості.

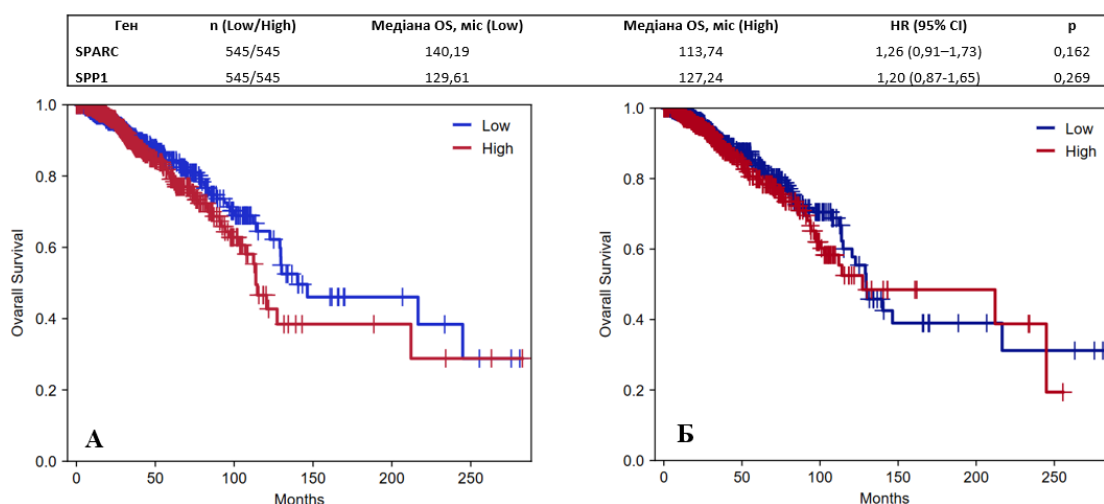


Рис. 6.8. Загальна виживаність хворих на РМЗ залежно від рівня експресії *SPARC* (А) та *SPP1* (Б) у пухлинній тканині. Примітка. OS (Overall Survival) — загальна виживаність; HR (Hazard Ratio) — відношення ризиків; 95 % CI (95 % Confidence Interval) — 95 % довірчий інтервал. Джерело: аналіз даних TCGA.

Таким чином, аналіз відкритих транскриптомних даних засвідчив статистично значуще підвищення експресії *SPP1* та *SPARC* у тканині РМЗ порівняно з немалігнізованою тканиною молочної залози, причому найбільше відносне підвищення було характерним для *SPP1*. Водночас рівні експресії обох генів не були пов'язані із стадією захворювання та не

продemonстрували статистично підтвердженого прогностичного значення щодо загальної виживаності у когорті TCGA. Виявлена міжпідстадійна варіабельність експресії *SPP1* може свідчити про її зв'язок з окремими етапами пухлинної прогресії, однак потребує перевірки в незалежних вибірках і підтвердження на рівні білка. Розбіжність між підвищеною експресією мРНК *SPP1* та відсутністю високої експресії OPN у матеріалах імуногістохімічного аналізу The Human Protein Atlas також вказує на необхідність окремої верифікації транскриптних і білкових показників.

6.2. Топологія та кількісні показники експресії матрицелюлярних генів у хворих на рак молочної залози

Матрицелюлярні білки є ключовими регуляторами ремоделювання позаклітинного матриксу та пухлинного мікрооточення, беручи участь у процесах клітинної адгезії, міграції, інвазії та прогресування злоякісних новоутворень. Біологічна активність цих білків значною мірою визначається не лише рівнем їх експресії, але й особливостями локалізації у різних структурних компонентах пухлини. У зв'язку з цим наступним етапом дослідження стало вивчення топології експресії OPN та ON у пухлинній тканині хворих на РМЗ із подальшим аналізом її взаємозв'язку з клініко-патологічними характеристиками новоутворень.

Аналіз результатів ІГХ дослідження показав значну варіабельність розташування клітин, які експресували OPN, навіть у пухлинах однакової гістологічної структури та ступеня диференціювання. Позитивна реакція з антитілами до OPN визначалась у вигляді коричневого забарвлення цитоплазми різного ступеня інтенсивності (від світло- до темнокоричневого). У тканині РМЗ виявлено експресію не лише в пухлинних клітинах (як в цитоплазмі так і у ядрах) (рис. 6.9), а також у елементах стромального мікрооточення. Зауважимо, що наявність імунопозитивної реакції була характерна також і для адипоцитів, що прилягали до пухлинної тканини.

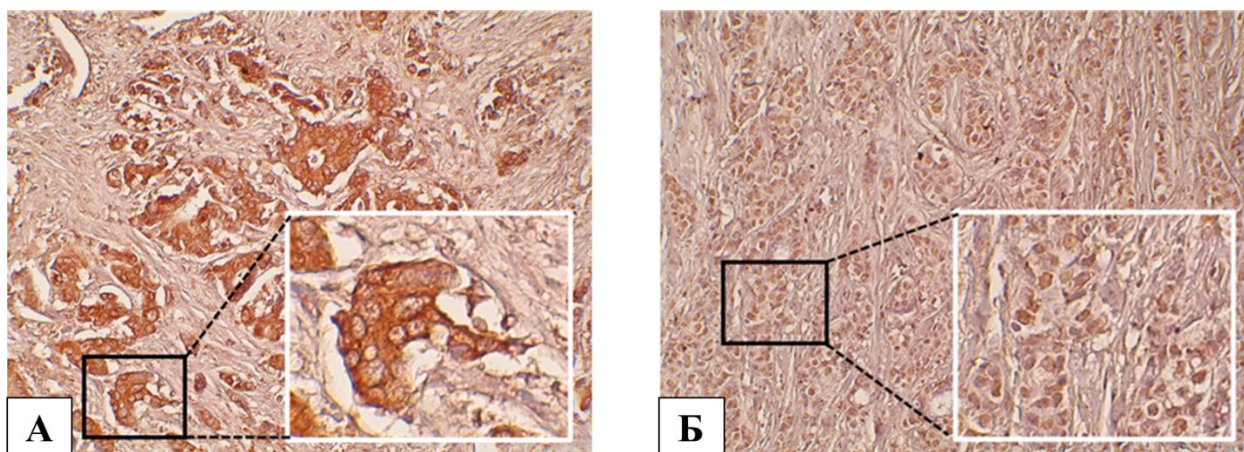


Рис. 6.9. Топологія експресії OPN у РМЗ: А – у цитоплазмі пухлинних клітин РМЗ; Б – в ядрах пухлинних клітин РМЗ. Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Майєр, $\times 400$.

Дослідження експресії іншого маркера - ON встановило його локалізацію виключно в цитоплазмі злоякісно трансформованих клітин молочної залоз. Крім того сильна імунопозитивна реакція з антитілами до ON спостерігалась у стромальному компоненті новоутворень, зокрема у фібробластах та макрофагах (рис. 6.10).

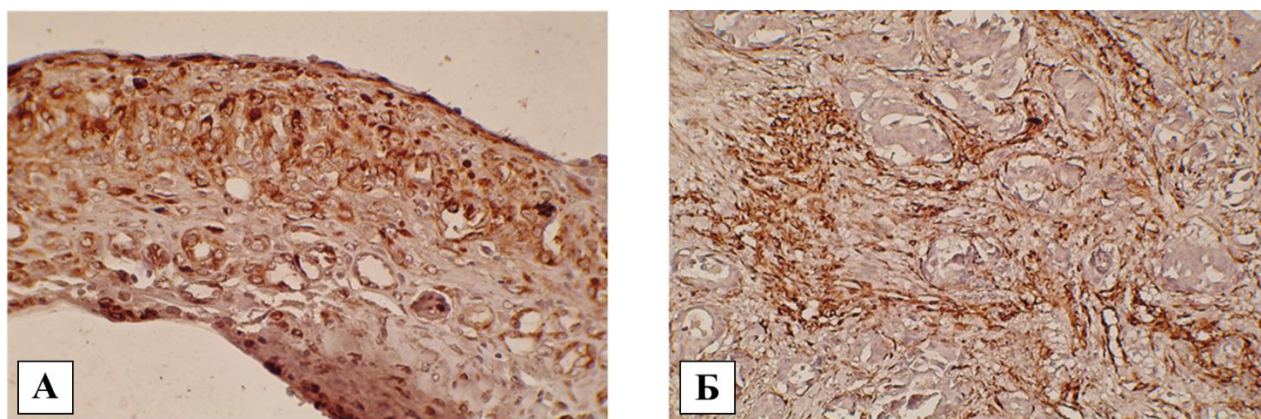


Рис. 6.10. Топологія експресії ON у тканині РМЗ: А – у пухлинних клітинах РМЗ, $\times 400$; Б – у фібробластах та елементах стромі, $\times 200$; Імуногістохімія, хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Дофарбовування гематоксиліном Майєр.

Наведене свідчить про варіабельний характер експресії

матрицелюлярних білків у клітинах різних морфологічних структур РМЗ, що стало підґрунтям для проведення їх кількісної оцінки та дослідження зв'язку з клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ.

Аналіз дозволив встановити достовірну залежність експресії OPN в ядрах пухлинних клітин від наявності метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах, а також ступеня диференціювання РМЗ. Як видно з даних, наведених на Рис. 6.11. локалізацію OPN в ядрах злоякісно трансформованих клітин частіше спостерігали у пухлинах пацієнтів із метастичним ураженням регіонарних лімфовузлів (68,0%) та низькодиференційованим РМЗ (70,0%).

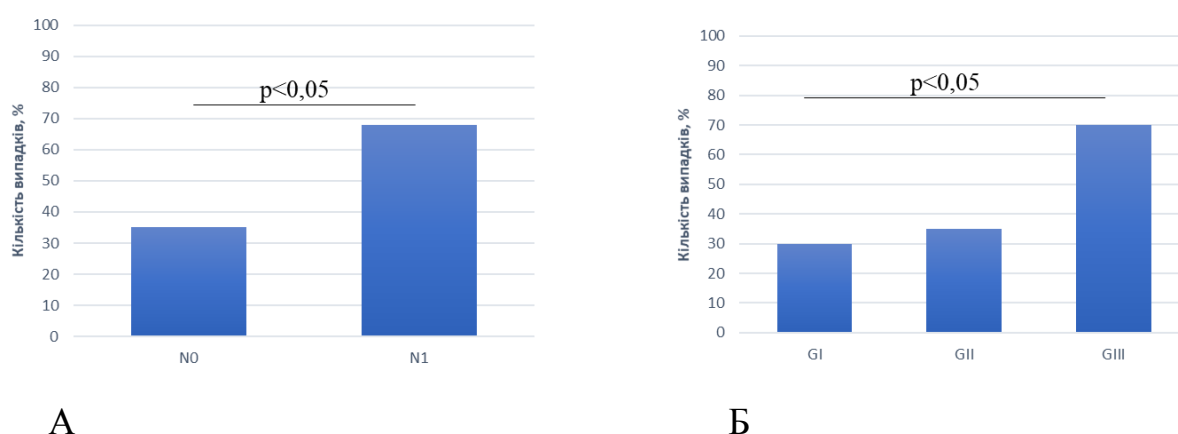


Рис. 6.11. Топологія експресії OPN на клітинному рівні у тканині РМЗ залежно від клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу: А – наявності метастазів в регіонарні лімфатичні вузли; Б – ступінь диференціювання

Наступним кроком нашої роботи став аналіз зв'язку експресії OPN в ядрах пухлинних клітин із маркером клітинної проліферативної активності – Ki-67, а також ER та PR у хворих на РМЗ (рис. 6.12).

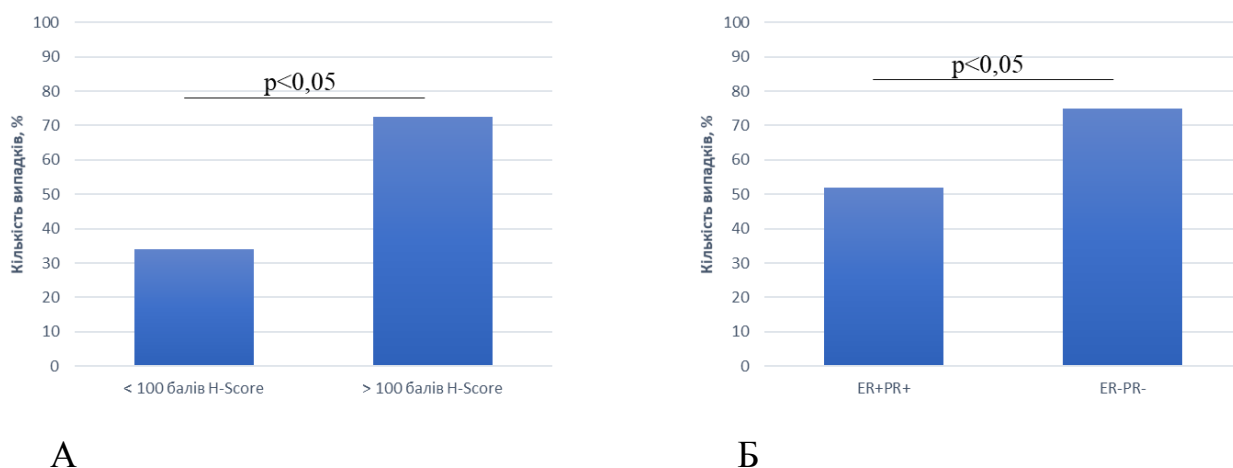


Рис. 6.12. Топологія експресії OPN на клітинному рівні у тканині РМЗ залежно від молекулярного профілю новоутворень: А – проліферативної активності; Б – експресії рецепторів ER та PR

Достовірно більша кількість випадків (в 2,1 раза ($p < 0,05$)) в яких виявлено локалізацію OPN в ядрах злоякісно трансформованих клітин було встановлено у новоутвореннях із високою проліферативною активністю (рівень експресії Ki-67 більше 100 балів H-Score) – 72,5%, порівняно з пацієнтками новоутворення яких характеризувались низьким рівнем експресії Ki-67 (рис. 6.12, А).

Продемонстровано, що експресія OPN в ядрах клітин частіше зустрічається у РМЗ із рецептор-негативним статусом ($p < 0,05$) (рис. 6.12, Б). Зокрема, кількість випадків із ядерною локалізацією OPN у яких була відсутня експресія ER та PR становила 75,0%, що в 1,44 рази більше ніж за наявності експресії рецепторів стероїдних гормонів.

Після вивчення особливостей топології OPN та ON проведено кількісну оцінку їх вмісту у пухлинній тканині хворих на РМЗ. Аналіз результатів ІГХ дослідження засвідчив помірний рівень експресії обох матрицелюлярних білків. Середнє значення для OPN становило $176,2 \pm 12,3$ бала H-Score (діапазон 65,0–264,0 бала), тоді як для ON — $184,5 \pm 9,6$ бала H-Score (діапазон 37,0–256,3 бала)

При зіставленні показників експресії досліджуваних маркерів у

пухлинній тканині хворих на РМЗ з основними клініко-патологічними характеристиками новоутворень статистично значущої залежності рівнів експресії OPN та ON від розміру первинного новоутворення не виявлено. Зокрема, у пацієнтів із T1-категорією пухлин середні показники становили $165,3 \pm 10,5$ та $188,3 \pm 8,7$ бала H-Score відповідно, тоді як у хворих із T2-категорією — $191,2 \pm 14,3$ та $180,3 \pm 9,5$ бала H-Score (рис. 6.13, А).

Достовірно більші значення OPN та ON у пухлинній тканині зафіксовано у хворих на РМЗ із наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах (рис. 6.13, Б). Зокрема рівень експресії OPN у хворих в яких було діагностовано метастази в регіонарних лімфатичних вузлах становив $194,3 \pm 12,3$ бала H-Score, що на 25,0% ($p < 0,05$) рази вище ніж у хворих без метастазів ($155,2 \pm 11,0$ бала H-Score). Рівень експресії ON в пухлинних клітинах хворих на РМЗ з метастазами в лімфатичних вузлах дорівнював $198,6 \pm 8,3$ бала H-Score і був на 17,0% ($p < 0,05$) разів більше порівняно із пацієнтками у яких метастази в регіонарних лімфатичних вузлах були відсутні ($168,5 \pm 7,7$ бала H-Score, відповідно).

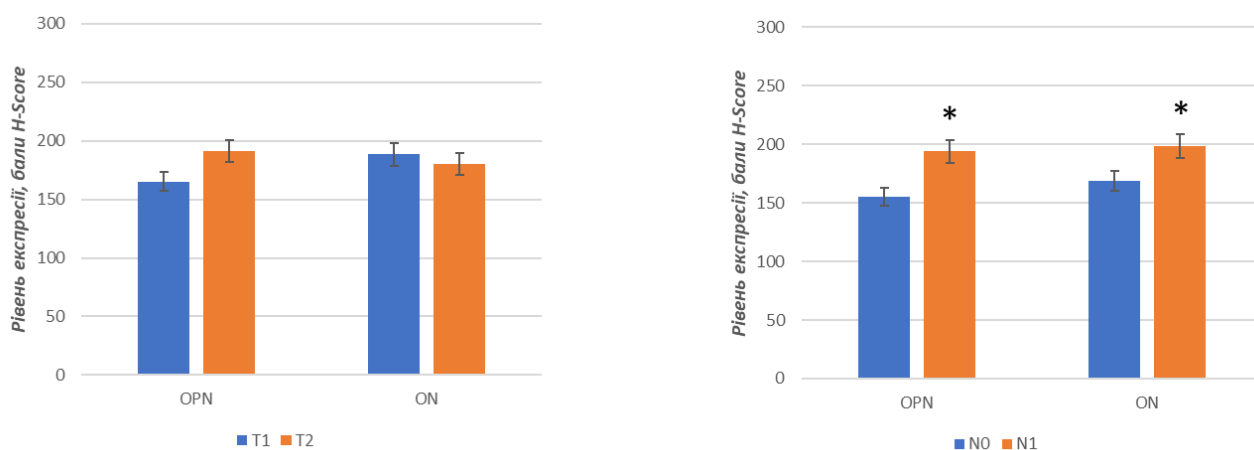
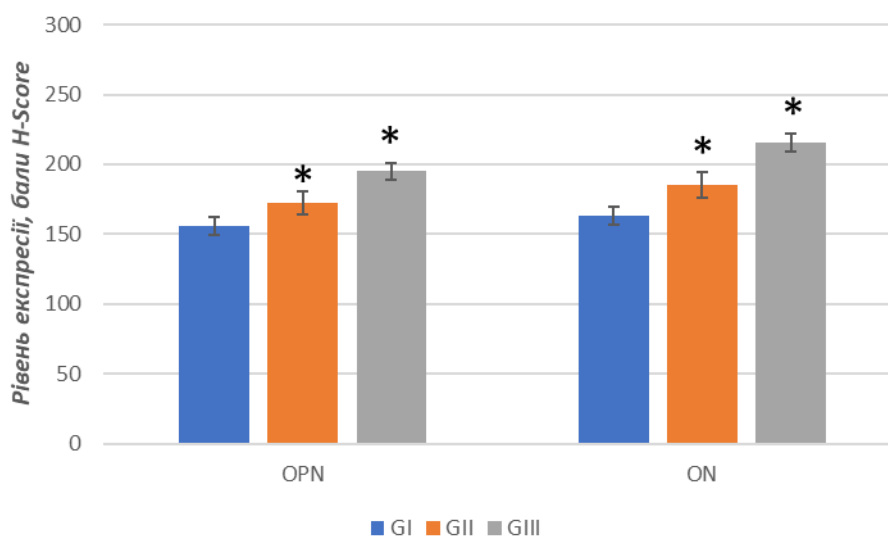


Рис. 6.13. Зв'язок показників експресії OPN та ON у тканині хворих на РМЗ від категорій Т (А) та N (Б) за класифікацією TNM.

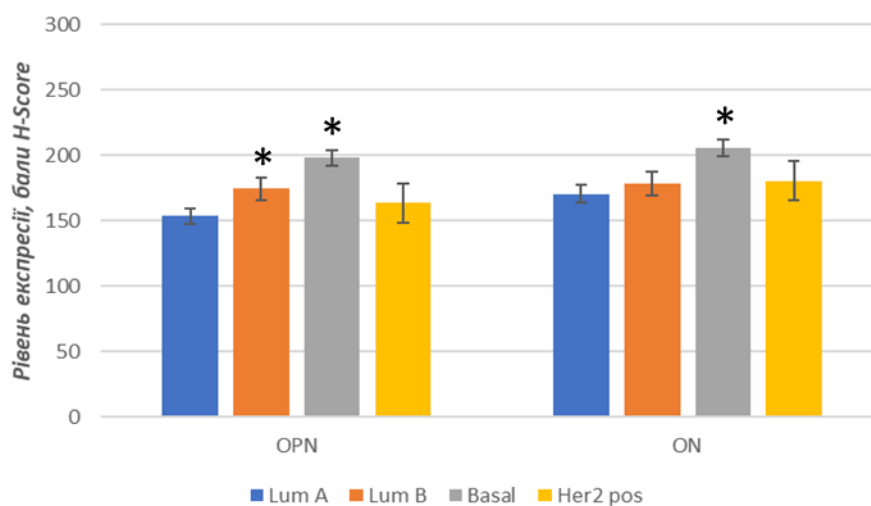
Примітка. * – різниця достовірна по відношенню до групи порівняння ($p < 0,05$).

Найвищі рівні експресії OPN та ON виявлені у пухлинній тканині хворих на низькодиференційований РМЗ, у порівнянні з новоутвореннями помірного та високого ступеня диференціювання. Так рівень OPN та ON у хворих із низькодиференційованим РМЗ становив $195,0 \pm 12,3$ та $215,2 \pm 9,7$ бали H-Score, відповідно, що на 25,0% ($p < 0,05$) та 31,0% ($p < 0,05$) у порівнянні із показниками пацієнток із високодиференційованими новоутвореннями (рис. 6.14, А).

Аналіз рівнів OPN та ON у пухлинній тканині хворих на РМЗ з різним молекулярним підтипом (рис. 6.14, Б) виявив, що у пацієнток з базальним молекулярним підтипом досліджені показники були вищим ($198,0 \pm 10,6$ та $205,6 \pm 8,8$ балів H-Score, відповідно), ніж аналогічні значення у люмінальному Б ($174,3 \pm 9,6$ та $178,3 \pm 9,3$ балів H-Score, відповідно) та люмінальному А підтипі ($153,6 \pm 12,2$ та $170,4 \pm 9,5$ балів H-Score, відповідно).



А



Б

Рис. 6.14. Зв'язок показників експресії OPN та ON у тканині хворих на РМЗ від ступеня диференціювання (А) та молекулярного підтипу новоутворень (Б). Примітка. * – різниця достовірна по відношенню до групи порівняння ($p < 0,05$)

Наступним етапом роботи став аналіз рівнів експресії генів *SPP1* та *SPARC* у пухлинній тканині хворих на РМЗ залежно від основних клініко-патологічних характеристик пухлинного процесу. Отримані результати наведено в таблиці 6.1. Аналіз показав, що рівні експресії досліджуваних

генів характеризувалися різною спрямованістю змін залежно від клініко-патологічних особливостей новоутворень.

Таблиця 6.1

Зв'язок експресії генів *SPP1* та *SPARC* у пухлинній тканині із основними клініко-патологічними характеристиками хворих на РМЗ

	<i>SPP1</i> (fold change)	<i>SPARC</i> (fold change)
Категорія T за TNM-класифікацією		
T ₁	2,3±0,5	1,6±0,2
T ₂	3,8±0,7 ¹	2,6±0,4 ¹
Категорія N за TNM-класифікацією		
N ₀	1,5±0,2	1,6±0,2
N ₁	3,9±0,9 ²	2,4±0,5 ²
Ступінь диференціювання		
Високий	2,8±0,3	2,1±0,3
Помірний	2,6±0,4	2,2±0,4
Низький	3,0±0,8	2,1±0,3
Молекулярний підтип		
Люмінальний А	0,7±0,2	1,3±0,2
Люмінальний Б	2,0±0,5 ³	1,4±0,4
Her2/neu- позитивний	2,7±0,9	2,1±0,3
Базальний	3,5±0,7 ^{3,4}	2,4±0,3 ^{3,4}

Примітки: ¹ – різниця статистично значуща порівняно з категорією T1 (p<0,05); ² – різниця статистично значуща порівняно з категорією N0 (p<0,05); ³ – різниця статистично значуща порівняно з люмінальним А молекулярним підтипом (p<0,05); ⁴ – різниця статистично значуща порівняно з люмінальним В молекулярним підтипом (p<0,05).

Проведений аналіз показав, що рівні експресії генів *SPP1* та *SPARC* залежать від розміру первинного новоутворення (рис. 6.15, А). Так, у пухлинній тканині хворих із категорією Т2 рівень мРНК *SPP1* був у 1,7 раза ($p<0,05$), а *SPARC* — у 1,6 раза ($p<0,05$) вищим порівняно з пацієнтками категорії Т1.

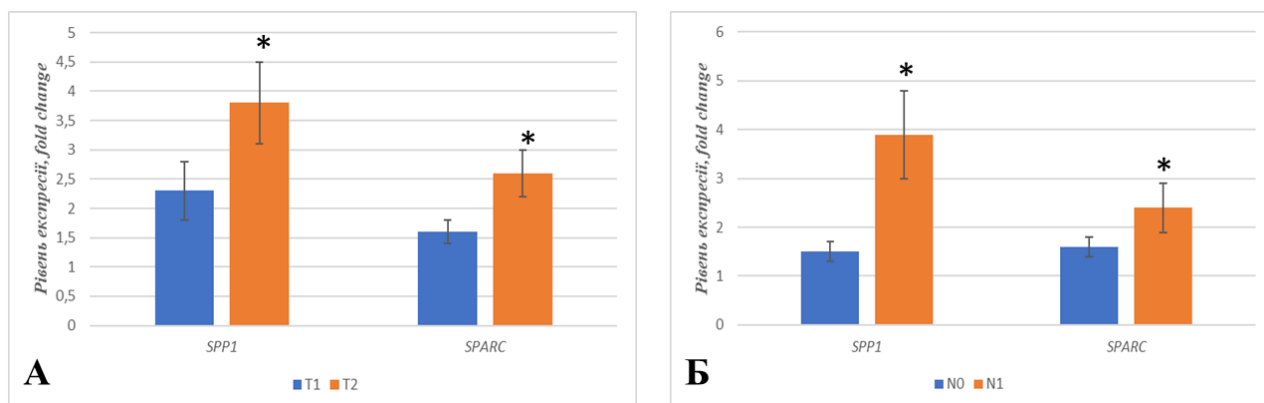


Рис. 6.15. Зв'язок показників експресії мРНК генів *SPP1* та *SPARC* у тканині хворих на РМЗ від категорій Т (А) та N (Б) за класифікацією TNM.

Примітка. * – різниця достовірна по відношенню до групи порівняння ($p<0,05$).

Проведений аналіз показав, що наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах також асоціювалася зі зростанням рівнів експресії досліджуваних генів (рис. 6.15, Б). Так, у пухлинній тканині хворих із категорією N1 рівень мРНК *SPP1* був у 2,6 раза ($p<0,05$), а *SPARC* — у 1,5 раза ($p<0,05$) вищим порівняно з пацієнтами без метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (категорія N0)

Аналіз рівнів експресії генів *SPP1* та *SPARC* залежно від ступеня диференціювання пухлин не виявив статистично значущих відмінностей між досліджуваними групами ($p>0,05$) (рис. 6.16).

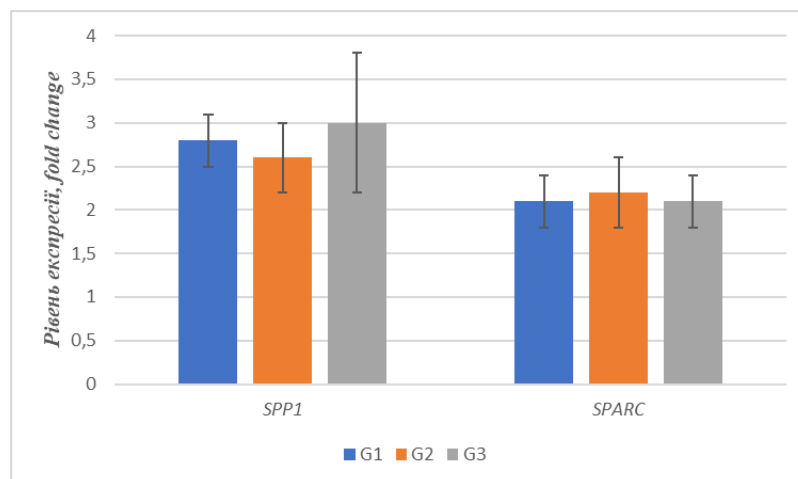


Рис. 6.16. Зв'язок показників експресії мРНК генів *SPP1* та *SPARC* у пухлинній тканині хворих на РМЗ залежно від ступеня диференціювання новоутворень

Водночас встановлено, що молекулярний підтип РМЗ асоціювався зі змінами рівнів експресії обох генів (рис. 6.17). Так, у пухлинній тканині хворих із базальним молекулярним підтипом рівень мРНК *SPP1* був у 5,0 раза ($p < 0,05$) вищим порівняно з люмінальним А та у 1,8 раза ($p < 0,05$) — порівняно з люмінальним В підтипом. Для *SPARC* достовірне підвищення експресії спостерігалось лише відносно люмінального А підтипу — у 1,8 раза ($p < 0,05$), тоді як відмінності між базальним та люмінальним В підтипами були статистично недостовірними.

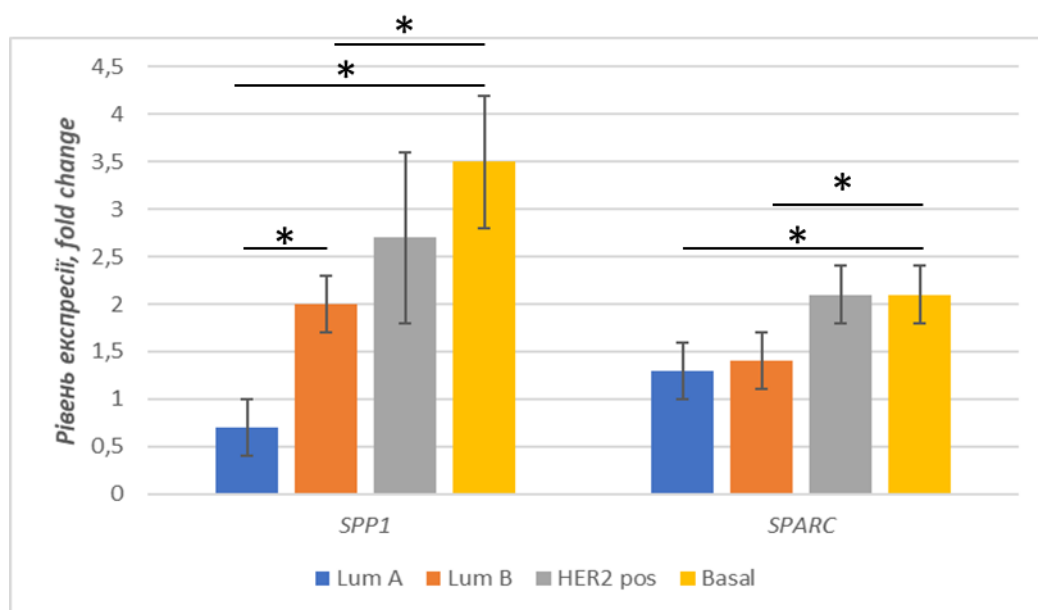


Рис. 6.17. Зв'язок показників експресії мРНК генів *SPP1* та *SPARC* у пухлинній тканині хворих на РМЗ з молекулярним підтипом новоутворень.

*Примітка.** — різниця статистично значуща ($p < 0,05$);

Таким чином, рівні експресії генів *SPP1* та *SPARC* у пухлинній тканині хворих на РМЗ асоціюються з окремими клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу. Найбільш виражені зміни виявлено у хворих із пухлинами більшого розміру, наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах та базальним молекулярним підтипом РМЗ.

6.3. Зв'язок експресії матрицелюлярних протеїнів із клітинною компонентою та цитокіновим профілем раку молочної залози

Наведені у попередньому підрозділі результати свідчать, що ON та OPN беруть участь у формуванні агресивного фенотипу РМЗ та асоціюються з окремими клініко-патологічними характеристиками пухлинного процесу. Водночас їх біологічна роль реалізується не ізольовано, а в тісній взаємодії з компонентами пухлинного мікрооточення, системною імунною відповіддю та механізмами посттранскрипційної регуляції.

З огляду на це, наступним етапом роботи став інтегральний аналіз взаємозв'язків між показниками експресії матрицелюлярних протеїнів,

станом імунної компоненти пухлинного мікрооточення та рівнем цитокінів у хворих на РМЗ з метою визначення їх комплексного значення для оцінки перебігу захворювання.

Аналіз зв'язку OPN із залученням, топологічним розподілом та функціональною активністю мастоцитів у тканині РМЗ показав, що характер МС інфільтрації залежав не лише від рівня, а й від топології експресії OPN у тканині пухлини. У новоутвореннях із високою експресією OPN клітинах кількість МС в інтратуморальній зоні пухлин зростала у 2.48 раза ($p=0.023$), тоді як їх кількість у стромі РМЗ знижувалася у 2.86 раза ($p=0.017$) (рис. 6.18). Така різноспрямована зміна може свідчити про перерозподіл МС зі стромального компонента до пухлинної паренхіми РМЗ

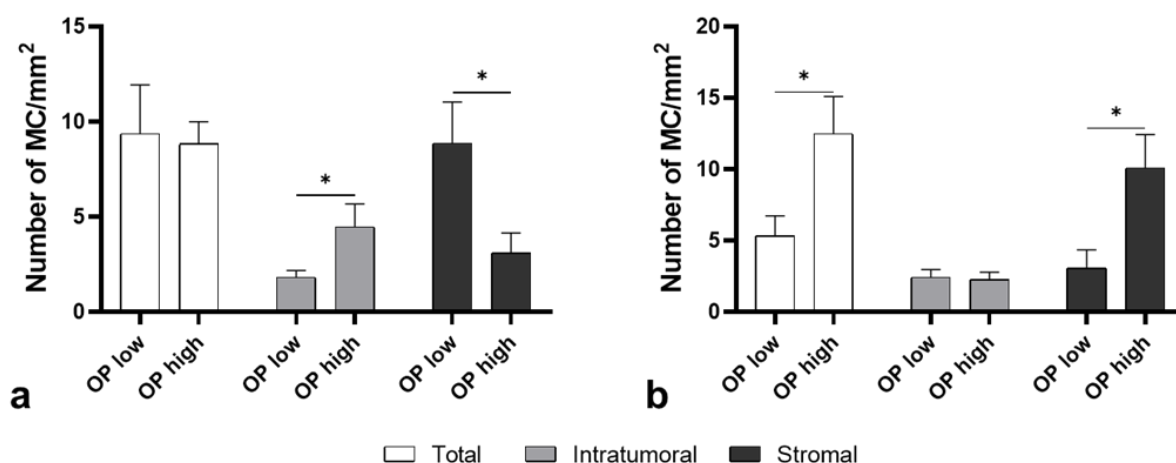


Рис. 6.18. Зв'язок топології експресії OPN (паренхіматозна (а) та стромальна(б)) з показниками інфільтрації МС у тканині РМЗ.

Примітка. * — відмінності статистично значущі порівняно з групою низької експресії OPN, $p<0,05$.

Інший характер взаємозв'язку встановлено для стромальної експресії OPN, високий рівень якої асоціювався зі зростанням загальної кількості МС у

2.36 раза ($p=0.022$) та збільшенням їх стромальної субпопуляції у 3.32 раза ($p=0.014$) (рис. 6. 18). Отже, паренхіматозна експресія OPN була переважно пов'язана з внутрішньопухлинним перерозподілом мастоцитів, тоді як стромальна — з їх накопиченням у мікрооточенні РМЗ.

Поряд із кількісними змінами виявлено зв'язок OPN із функціональним станом МС. Висока експресія цього протеїну незалежно від її локалізації у тканині РМЗ асоціювалася з посиленням дегрануляції мастоцитів. Зростання паренхіматозної експресії OPN супроводжувалося підвищенням функціональної активності МС на 54,38% ($p=0.033$), а високий рівень стромальної експресії — на 101% ($p=0.042$) (рис. 6.19).

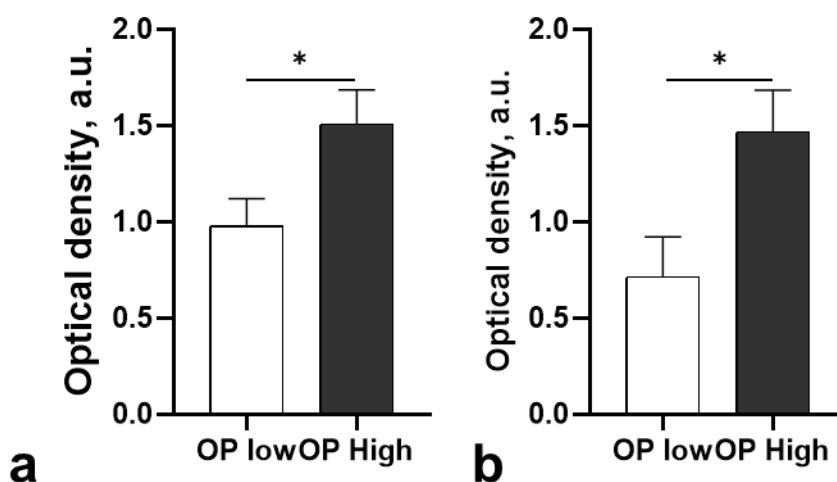


Рис. 6.19. Зв'язок топології експресії OPN (паренхіматозна (а) та стромальна(б)) з показниками дегрануляції МС у тканині РМЗ.

Примітка. * — відмінності статистично значущі порівняно з групою низької експресії OPN, $p<0,05$

Для деталізації встановлених взаємозв'язків проведено аналіз показників мастоцитарної інфільтрації та дегрануляції залежно від топології експресії OPN і клініко-патологічних характеристик РМЗ (табл. 6.2) Підвищена експресія OPN у паренхіматозному компоненті асоціювалася зі збільшенням кількості мастоцитів в інтратуморальній зоні та одночасним зменшенням їх кількості у стромі незалежно від статусу ураження

регіонарних лімфатичних вузлів. Більша кількість інтратуморальних мастоцитів у пухлинах категорії T1 та стромальних мастоцитів у новоутвореннях категорії T2 також була пов'язана з високою експресією OPN.

У пухлинах категорії T1 за умов високої експресії OPN кількість інтратуморальних MC була у 4,04 раза більшою, ніж за низької експресії цього маркера. У новоутвореннях категорії T2 висока експресія OPN асоціювалася зі збільшенням стромальної інфільтрації тканини PM3 MC у 5,00 разів.

У пацієнтів категорії N0 кількість інтратуморальних MC за умов високої експресії OPN перевищувала аналогічний показник при низькому рівні цього протеїну в 3,20 раза, тоді як у групі N1 — у 2,54 раза. Окрім цього, у хворих із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів висока експресія OPN асоціювалася зі зростанням індексу дегрануляції мастоцитів у 2,62 раза (табл. 6.2).

Додатково виявлено залежність між паренхіматозною експресією OPN, функціональним станом MC та ступенем диференціювання пухлини (табл. 6.2). Зокрема, за умов високого рівня OPN індекс дегрануляції MC у новоутвореннях G1 перевищував аналогічний показник при низькій експресії цього протеїну в 7,35 раза, тоді як у пухлинах G3 — в 1,74 раза. Отримані дані підтверджують зв'язок між активною паренхіматозною продукцією OPN та інтенсифікацією функціональної активності мастоцитарного інфільтрату незалежно від ступеня малігнізації.

Таблиця 6.2

**Зв'язок рівня експресії OPN у паренхіматозному компоненті РМЗ зі
ступенем інфільтрації та дегрануляції МС у хворих
з різним клінічним статусом**

		OPN	MC infiltration level, cells/mm ²			DI
			Total	Intratumoral	Stromal	
Tumor size (T)	T1	low	6.024±1.318	0.954±0.539	6.596±0.811	0.800±0.219
		high	8.958±1.726	3.857±0.882	5.977±0.749	0.667±0.183
	T2	low	7.116±1.599	1.792±0.426	1.303±0.538	1.250±0.209
		high	4.886±1.048	1.692±0.205	6.515±0.992	1.333±0.264
Lymph node involvement (N)	N0	low	9.370±1.103	1.248±0.407	8.099±0.580	0.886±0.223
		high	11.071±2.861	3.996±0.711	6.753±0.413	1.614±0.169
	N1	low	11.193±1.447	1.480±0.389	10.122±0.876	1.105±0.111
		high	12.006±1.590	3.764±0.272	8.219±0.633	2.899±0.213
Stage	I	low	10.108±1.902	2.709±0.561	7.662±0.599	1.309±0.078
		high	11.007±1.385	3.673±1.344	7.304±0.820	1.175±0.387
	II	low	11.317±0.724	2.740±0.831	8.491±0.346	1.229±0.316
		high	10.592±1.338	3.071±0.530	8.569±0.558	1.693±0.295
Tumor grade (G)	G1	low	12.288±1.094	2.893±0.529	9.679±1.120	0.314±0.096
		high	12.654±0.711	3.409±0.318	9.940±0.835	2.308±0.478
	G2	low	11.612±0.993	2.443±0.398	9.207±1.277	1.437±0.227
		high	11.108±0.708	2.490±0.442	8.682±1.094	1.729±0.205
	G3	low	7.723±1.020	4.599±0.507	3.083±0.574	1.180±0.173
		high	8.205±0.746	4.424±0.566	3.749±0.499	2.056±0.301
Histological type	Ductal	low	11.602±1.539	3.571±1.076	7.930±0.519	1.556±0.156
		high	12.516±2.074	3.604±0.849	8.914±1.109	1.209±0.340
	Lobular	low	9.662±0.996	2.462±1.308	7.339±0.732	1.311±0.208
		high	9.615±1.737	4.647±1.765	6.803±0.608	1.384±0.149
Molecular subtype	Lum A	low	9.314±0.641	2.917±0.458	6.337±0.981	1.336±0.108
		high	8.921±0.922	3.106±0.390	5.802±0.506	1.205±0.343
	Lum B	low	10.704±0.919	2.892±0.346	9.593±0.466	1.493±0.236
		high	10.981±1.184	3.720±0.688	9.708±0.529	1.599±0.104
	HER2/ne u pos	low	11.001±0.839	2.990±0.706	7.464±0.378	0.833±0.473
		high	9.650±1.317	1.841±0.642	7.801±0.407	1.602±0.533
	Basal	low	11.108±1.672	4.089±0.619	9.079±1.203	1.488±0.609
		high	13.677±1.948	3.227±0.308	11.314±0.944	1.782±0.371

Аналіз стромальної експресії OPN продемонстрував, що її високі значення корелюють із посиленням мастоцитарної інфільтрації за умов прогресування пухлинного процесу (табл. 6.3). Так, у пухлинах категорії T2 щільність стромальних МС на тлі високої експресії OPN була в 1,78 раза вищою, ніж при її низьких показниках. За наявності метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах зафіксовано зростання як загального, так і стромального

пулу мастоцитів, що супроводжувалося підвищенням індексу їх дегрануляції в 1,52 раза (табл. 6.3).

Таблиця 6.3

Зв'язок рівня експресії OPN у стромальному компоненті РМЗ зі ступенем інфільтрації та дегрануляції МС у хворих з різним клінічним статусом

		OPN	MC infiltration level, cells/mm ²			DI
			Total	Intratumoral	Stromal	
Tumor size (T)	T1	low	10.590±1.369	3.909±0.904	5.026±1.303	0.975±0.269
		high	12.582±1.663	3.257±0.418	10.45±1.595	1.469±0.314
	T2	low	6.638±2.401	2.059±0.506	3.746±0.516	1.258±0.196
		high	8.583±1.677	2.932±0.499	6.678±0.702	1.530±0.233
Lymph node involvement (N)	N0	low	10.459±1.118	1.996±0.428	8.786±0.921	1.045±0.198
		high	9.782±0.935	2.701±0.476	7.093±1.110	1.336±0.185
	N1	low	7.656±0.847	2.087±0.483	5.921±1.073	1.260±0.103
		high	11.812±0.994	2.689±0.379	10.317±1.644	1.913±0.200
Stage	I	low	10.604±0.702	2.885±0.602	7.946±1.003	0.663±0.076
		high	10.297±0.998	3.232±0.477	7.311±0.739	1.552±0.292
	II	low	12.420±1.324	2.574±0.413	8.427±0.659	1.617±0.424
		high	11.009±0.640	2.379±0.761	8.771±0.507	1.426±0.137
Tumor grade (G)	G1	low	9.209±1.208	3.090±0.372	8.403±1.533	1.117±0.462
		high	13.948±1.571	3.233±0.248	15.784±2.845	1.395±0.288
	G2	low	7.754±1.140	2.260±0.673	6.611±1.374	1.166±0.111
		high	12.549±1.715	2.415±0.357	10.306±1.387	1.933±0.209
	G3	low	6.287±0.926	3.964±0.974	1.834±0.781	1.386±0.288
		high	9.921±1.439	4.729±0.402	6.202±1.034	2.078±0.294
Histological type	Ductal	low	13.693±2.780	2.980±0.834	9.038±1.394	1.033±0.306
		high	11.457±1.662	3.839±0.576	8.117±1.035	1.425±0.377
	Lobular	low	8.994±1.090	2.761±0.579	7.295±1.433	1.376±0.280
		high	9.850±1.386	2.109±0.301	7.066±1.290	1.313±0.165
Molecular subtype	Lum A	low	7.713±1.578	2.984±0.784	5.096±1.006	1.297±0.062
		high	8.092±1.936	2.883±0.208	6.359±0.959	1.356±0.146
	Lum B	low	10.600±1.349	3.117±0.934	6.898±1.204	1.711±0.511
		high	14.097±1.046	5.274±0.487	9.475±1.238	1.433±0.384
	HER2/neu pos	low	9.424±1.489	1.076±0.399	6.501±0.947	1.247±0.472
		high	7.892±0.894	1.742±0.137	8.397±1.831	1.289±0.205
	Basal	low	11.228±2.463	3.408±0.942	8.672±1.575	1.636±0.450
		high	17.836±1.874	6.769±1.253	12.312±1.773	1.524±0.344

Висока стромальна експресія OPN була пов'язана зі зростанням мастоцитарної інфільтрації у пухлинах різного ступеня диференціювання. У новоутвореннях G1 збільшувалися загальна та стромальна кількість МС, причому стромальна інфільтрація була у 1,88 раза вищою. У пухлинах G2 високий рівень OPN також супроводжувався збільшенням загальної і стромальної інфільтрації та підвищенням індексу дегрануляції у 1,66 раза.

Найбільш виражені зміни стромальної популяції МС виявлено у пухлинах G3, де її кількість за високої експресії OPN була у 3,38 раза більшою, а індекс дегрануляції — у 1,50 раза вищим, ніж за низької експресії.

Зв'язок стромальної експресії OPN із мастоцитарною інфільтрацією простежувався також у люмінальному В та базальному молекулярних підтипах РМЗ. У пухлинах люмінального В підтипу високий рівень OPN асоціювався зі збільшенням загальної, інтратуморальної та стромальної кількості МС, при цьому найбільш вираженим було зростання інтратуморальної субпопуляції — у 1,69 раза. У базальному підтипі також спостерігалось збільшення всіх досліджуваних показників мастоцитарної інфільтрації, а кількість інтратуморальних МС була майже у 2 рази більшою, ніж за низької стромальної експресії OPN.

Таким чином, експресія OPN у тканині РМЗ асоціюється з кількістю, топологічним розподілом і функціональним станом МС. Паренхіматозна експресія OPN переважно пов'язана з накопиченням МС в інтратуморальній зоні та їх перерозподілом між паренхімою і стромою. Висока стромальна експресія OPN асоціюється зі збільшенням загальної та стромальної мастоцитарної інфільтрації, зокрема у хворих із метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів, у низькодиференційованих пухлинах, а також у люмінальному В і базальному молекулярних підтипах. Незалежно від топології, високий рівень OPN пов'язаний із посиленням дегрануляції мастоцитів. Це дозволяє розглядати OPN як потенційний компонент регуляції мастоцитарної ланки стромально-імунного мікрооточення РМЗ.

Після оцінки взаємозв'язку матрицелюлярних білків із локалізацією та функціональним станом мастоцитів було проаналізовано їхні асоціації з макрофагальним компонентом мікрооточення РМЗ. Ступінь інфільтрації пухлини CD68⁺ - та CD163⁺ -макрофагами не демонстрував статистично значущої залежності від рівня паренхіматозної експресії OPN та SPARC (ON). Натомість достовірні кореляції було зафіксовано виключно для стромальної експресії OPN. Зокрема, у новоутвореннях із високою

продукцією стромального OPN кількість $CD163^+$ пухлино-асоційованих макрофагів перевищувала аналогічний показник у групі з низькою експресією у 2,17 раза, становлячи 51,30 (33,88–90,23) проти 23,62 (18,89–25,24) клітин відповідно ($p=0,008$) (рис. 6.20, Б). Водночас кількість $CD68^+$ макрофагів у пухлинах із високою експресією OPN була у 2,06 раза меншою (52,93 (32,33–62,66) проти 109,45 (65,07–140,35) відповідно; $p=0,0271$) (Рис. 6.20, А).

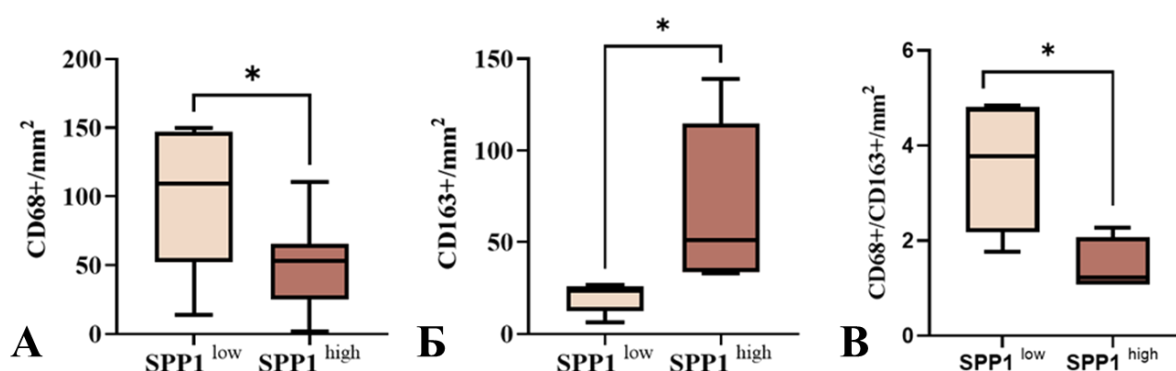


Рис. 6.20. Кількість $CD68^+$ (А), $CD163^+$ (Б) макрофагів та співвідношення $CD68/CD163$ (В) у пухлинній тканині залежно від рівня стромальної експресії OPN. Примітка. * – достовірні відмінності порівняно з групою низької експресії OPN ($p<0,05$).

Поряд із визначенням абсолютної кількості $CD68^+$ та $CD163^+$ макрофагів проведено аналіз їх співвідношення ($CD68/CD163$), яке є інтегральним показником, що характеризує особливості фенотипового складу макрофагальної інфільтрації пухлинного мікрооточення. На відміну від оцінки окремих субпопуляцій, цей показник дозволяє визначити співвідношення загальної популяції пухлино-асоційованих макрофагів до $CD163^+$ субпопуляції.

Встановлено, що у пухлинах із високою стромальною експресією OPN співвідношення $CD68/CD163$ було достовірно нижчим порівняно з пухлинами, які характеризувалися низьким рівнем експресії OPN (1,23 (1,08–

1,89) проти 3,78 (2,59–4,78) відповідно; $p=0,036$) (рис. 6.20, В). Отримані результати свідчать про збільшення частки CD163⁺ макрофагів серед загальної популяції пухлино-асоційованих макрофагів у новоутвореннях із високою експресією OPN.

На відміну від OPN, для стромальної експресії ON статистично значущих асоціацій із показниками макрофагальної інфільтрації пухлинної тканини не виявлено.

Таким чином, підвищена OPN у стромальні компоненті РМЗ асоціюється зі змінами макрофагальної інфільтрації пухлинної тканини, що характеризуються зменшенням кількості CD68⁺ макрофагів, збільшенням кількості CD163⁺ макрофагів та зниженням співвідношення CD68/CD163. Отримані результати свідчать про взаємозв'язок високої стромальної експресії OPN із переважанням CD163⁺ субпопуляції пухлино-асоційованих макрофагів у мікрооточенні раку молочної залози.

Результати проведених досліджень в розділі 6, опубліковано у [119, 123-125, 127]

РОЗДІЛ 7. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Рак молочної залози є біологічно гетерогенним захворюванням, перебіг якого визначається не лише молекулярними властивостями злоякісно трансформованих клітин, а й характером їх взаємодії з імунними, стромальними та гуморальними компонентами ТМЕ. Сучасні уявлення про канцерогенез розглядають мікрооточення як динамічну регуляторну систему, здатну підтримувати проліферацію, фенотипову пластичність, інвазію, метастазування, імунне ухилення та формування резистентності до лікування [10–18]. Просторова організація клітинних популяцій, співвідношення їх функціональних станів і склад локальної медіаторної мережі можуть суттєво відрізнятися навіть у пухлинах одного молекулярного підтипу [4, 17, 23]. Саме тому оцінка окремого маркера без урахування його клітинного джерела, топології та взаємозв'язку з іншими компонентами не дає повного уявлення про біологічні властивості РМЗ.

Концепція цього дослідження базувалася на комплексному аналізі стромально-імунного компонента мікрооточення РМЗ. Оцінку клітинної ланки здійснювали за щільністю та просторовою топографією CD68⁺ - і CD163⁺ -макрофагів, а також за чисельністю, локалізацією, дегрануляційною здатністю та ступенем зрілості мастоцитів МС. Гуморальний контур регуляції описували за сироватковими рівнями ІЛ-6 і ІЛ-10 та експресією відповідних генів безпосередньо у пухлинній тканині. При цьому матрицелюлярні протеїни OPN та ON розглядали як позаклітинні регулятори міжклітинних та імунних взаємодій, а не як ізольовані маркери. На посттранскрипційному рівні досліджували експресію miR-26a-5p, miR-155-5p та miR-18a-5p, чий потенційні гени-мішені залучені до цитокінового сигналіngu, рекрутування мієлоїдних клітин та ремоделювання екстрацелюлярного матриксу.

Такий підхід дозволив оцінити не лише зв'язок окремих показників із клініко-патологічними характеристиками РМЗ, але й сформувати цілісне уявлення про взаємодію клітинних, цитокінових, матрицелюлярних і мікроРНК-регуляторних механізмів. Одержані результати свідчать, що агресивний фенотип РМЗ супроводжується не односпрямованою активацією певного компонента, а перебудовою всієї системи мікрооточення, у межах якої кількість клітин, їх локалізація, функціональний стан і спектр міжклітинних сигналів можуть змінюватися відносно незалежно.

Однією з найбільш численних і функціонально пластичних популяцій у мікрооточенні РМЗ є пухлинно-асоційовані макрофаги. Сучасні дані свідчать, що їх фенотипові стани формують безперервний спектр, а традиційний поділ на M1- і M2-макрофаги є спрощеною моделлю [48–54]. У проведеному дослідженні CD68 використовували для характеристики загальної макрофагальної популяції, тоді як CD163 — для оцінки представленості клітин із переважними ознаками M2-подібного фенотипу. Важливо, що співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ не може безпосередньо трактуватися як співвідношення M1/M2; воно відображає відносну частку $CD163^+$ -клітин у загальній макрофагальній інфільтрації.

За результатами імуногістохімічного аналізу $CD68^+$ -макрофаги локалізувалися переважно у стромальному компоненті пухлини, формуючи ділянки різної щільності поблизу пухлинних комплексів і судин. $CD163^+$ -клітини частіше визначали у глибоких ділянках строми, периваскулярних, фіброзних і некротичних зонах. Виявлена топологічна неоднорідність узгоджується з концепцією тканинних територій, відповідно до якої функціональні стани TAM значною мірою визначаються локальними умовами — гіпоксією, судинним забезпеченням, складом матриксу та близькістю до пухлинних клітин [23]. Отже, біологічне значення макрофагів при РМЗ залежить не лише від їх загальної кількості, але й від просторової організації інфільтрату.

Кількісний аналіз показав, що зі збільшенням поширеності пухлинного процесу зростала загальна макрофагальна інфільтрація. У тканині РМЗ II стадії кількість $CD68^+$ -клітин була у 1,9 раза вищою, ніж при I стадії; у пухлинах категорії T2 — у 2,0 раза вищою порівняно з T1, а за наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів — у 1,4 раза вищою, ніж у групі N0. Ці закономірності узгоджуються з даними систематичних оглядів і метааналізів, у яких високу щільність TAM пов'язують із прогресуванням РМЗ та несприятливішим перебігом захворювання [55, 56]. Водночас незалежність $CD68^+$ -інфільтрації від гістологічного типу пухлини вказує на те, що динаміка цього показника відображає насамперед біологічну активність і поширеність пухлинного процесу, а не морфологічний варіант карциноми. Найвища щільність $CD163^+$ -макрофагів зафіксована в низькодиференційованих карциномах та новоутвореннях базального молекулярного підтипу. Зокрема, у пухлинах ступеня G3 кількість $CD163^+$ -клітин перевищувала аналогічний показник високкодиференційованих аналогів у 3,6 раза. Характерно, що за умов базального РМЗ спостерігалось зростання щільності обох досліджуваних макрофагальних популяцій. Зниження співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ у базальному підтипі та G3-пухлинах свідчить про відносне переважання $CD163^+$ -компоненти, що може бути однією з ознак імуносупресивно орієнтованого мієлоїдного мікрооточення. Така інтерпретація узгоджується з даними про зв'язок високої щільності $CD163^+$ -TAM із агресивними характеристиками і гіршими клінічними наслідками при РМЗ [59].

Різностямований характер змін співвідношення $CD68^+ / CD163^+$ за умов категорій T2, N⁺ та високого індексу Ki-67 свідчить, що збільшення розмірів пухлини, лімфогенне метастазування та висока проліферативна активність не є тотожними біологічними станами мікрооточення. Якщо при T2 і N⁺ зсув цього коефіцієнта зумовлений переважним рекрутуванням загальної $CD68^+$ -популяції, то при G3 та базальному підтипі — селективним накопиченням M2-поляризованих $CD163^+$ -клітин. Це обґрунтовує

доцільність комплексного аналізу: паралельної оцінки абсолютної кількості обох субпопуляцій, їхнього індексу та просторової топографії. Окреслена гетерогенність може пояснювати суперечливість літературних даних, де прогностична значущість ТАМ залежала від методології підрахунку, тканинного компартмента та молекулярного підтипу карциноми. [56, 60].

Мастоцити становили іншу функціонально важливу складову мієлоїдного мікрооточення. Їх біологічний вплив при солідних пухлинах є подвійним: секреція протеаз, VEGF, гістаміну, IL-10 і TGF- β може сприяти ангиогенезу, ремоделюванню матриксу й імуносупресії, тоді як вивільнення TNF- α та хемокінів за певних умов підтримує протипухлинну імунну відповідь [30–41]. У проведеному дослідженні тканина РМЗ характеризувалася дворазовим підвищенням загальної щільності МС порівняно з ФА, причому кількість інтратуморальних клітин була більшою у 5,9 раза. Водночас індекс дегрануляції у ФА перевищував показник РМЗ на 34 %. Таким чином, злоякісна трансформація супроводжувалася насамперед накопиченням МС усередині пухлинного компонента, але не обов'язковим посиленням їх дегрануляційної активності.

Диференціація кількісних параметрів та функціонального стану МС має фундаментальне значення. Висока щільність мастоцитарного інфільтрату не є прямим еквівалентом інтенсивного вивільнення біологічно активних речовин. Це зумовлено тим, що активація клітин може реалізуватися як шляхом тотальної, так і поступової дегрануляції, внаслідок чого певна частина пулу зберігає свій гранулярний апарат. [32, 33]. Саме цим може пояснюватися поєднання високої інтратуморальної інфільтрації при РМЗ із низьким індексом дегрануляції порівняно з ФА. Отримані дані доповнюють літературні відомості, згідно з якими клінічне значення МС залежить від просторової локалізації та функціонального стану: стромальна інфільтрація в окремих когортах асоціювалася зі сприятливішим прогнозом, тоді як триптазна активність — з інвазією й метастазуванням [42–44].

У межах когорти РМЗ показники мастоцитарної інфільтрації були пов'язані з низкою ознак злоякісності. Для Т1-пухлин була характерна вища інтратуморальна щільність, тоді як при метастатичному ураженні лімфатичних вузлів зростала стромальна інфільтрація. У G3-пухлинах загальна та інтратуморальна кількість мастоцитів зменшувалася, але їх стромальна представленість зростала. Отже, у процесі прогресування відбувався не лише кількісний, а й просторовий перерозподіл цієї клітинної популяції. Підвищення загальної, інтратуморальної та стромальної інфільтрації при високому Ki-67, а також збільшення кількості мастоцитів у HER2/neu-позитивних пухлинах підтверджують зв'язок мастоцитарної реакції з проліферативно активними варіантами РМЗ.

Індекс дегрануляції відображав автономний аспект функціонального стану мастоцитів. Його зростання за умов клінічної категорії II, параметрів T2, N⁺, низького ступеня диференціювання та PR-негативного статусу свідчить про те, що активація МС посилюється в міру набуття пухлиною більш агресивного фенотипу, навіть на тлі редукції абсолютної кількості клітин у конкретному тканинному компартменті. Водночас індекс зрілості МС не демонстрував кореляційних зв'язків із їхньою загальною чисельністю, рівнем дегрануляції чи топографічними особливостями (інтратуморальною чи стромальною локалізацією). Означений факт підтверджує, що інфільтрація, функціональна активація та ступінь зрілості є автономними характеристиками мастоцитарної реакції. Нижчі значення індексу зрілості при N⁺ та його варіабельність залежно від HER2/neu-статусу можуть бути наслідком модулювального впливу локального цитокіново-стромального мікрооточення на процеси клітинного диференціювання, проте каузальний характер цих взаємозв'язків потребує подальшої верифікації. Загалом результати дослідження макрофагів і мастоцитів демонструють, що мієлоїдний компонент РМЗ не може бути охарактеризований одним кількісним показником. Для макрофагів інформативними є щільність CD68⁺ - і CD163⁺ -клітин, їх співвідношення та топологія; для МС —

загальна, інтратуморальна і стромальна кількість, дегрануляція та зрілість. Виявлена відсутність прямого зв'язку між окремими характеристиками свідчить про паралельне існування кількох функціональних програм, які можуть по-різному впливати на перебіг пухлинного процесу.

Цитокінові механізми регуляції макрофагального та мастоцитарного компонентів.

Цитокіни забезпечують функціональний зв'язок між пухлинними, імунними та стромальними клітинами. IL-6 є плейотропним медіатором, здатним активувати JAK/STAT3-залежні програми проліферації, клітинної пластичності, ангіогенезу і резистентності, тоді як IL-10 переважно обмежує запальну відповідь, пригнічує антигенпрезентацію та цитотоксичну Т-клітинну активність [24, 26, 94–101]. Водночас біологічне значення обох цитокінів залежить від клітинного джерела, локалізації і загального медіаторного контексту, тому їх ізольоване визначення не завжди відображає напрям імунної відповіді.

У досліджуваній нами когорті хворих на РМЗ сироваткові рівні IL-6 та IL-10 характеризувалися значною індивідуальною варіабельністю. Для більшості клініко-патологічних груп статистично значущих відмінностей не встановлено, що вказує на обмежену інформативність одноразового системного вимірювання цитокіну як самостійного маркера. Найбільш чіткою тенденцією виявилось зростання рівня IL-6 у міру зниження ступеня диференціювання пухлини: у карциномах G3 його концентрація перевищувала аналогічний показник для категорії G2 у 3,3 раза. Пікові значення цитокіну зафіксовано також при базальному молекулярному підтипі, проте суттєва варіабельність даних у межах вибірки обмежила досягнення рівня статистичної значущості при деяких міжгрупових зіставленнях. Виявлена спрямованість узгоджується з участю IL-6 у підтриманні високопроліферативних і пластичних станів пухлинних клітин [95–98].

Рівні IL-10 також мали тенденцію до підвищення при G3 та базальному РМЗ, проте без статистичного підтвердження у більшості порівнянь. Це може бути пов'язано з тим, що сироваткова концентрація відображає сумарну продукцію цитокіну різними органами і клітинними популяціями, а не лише пухлинним осередком. Крім того, локальна і системна експресія можуть мати різне клінічне значення: у літературі підвищення циркулюючого IL-6 пов'язували з поширеним процесом і гіршою виживаністю, тоді як висока тканинна експресія IL-6 та IL-10 при ранньому РМЗ в окремих когортах асоціювалася зі сприятливішим прогнозом [99, 100].

Найбільш вагомими стали результати інтегрованого аналізу цитокінів і макрофагальної інфільтрації. У пацієнток із високим рівнем IL-6 у сироватці крові кількість CD68⁺ - і CD163⁺ -макрофагів була відповідно у 11,14 та 5,11 раза вищою, а при високому IL-10 кількість CD163⁺ -клітин зростала у 12,01 раза. Аналогічна спрямованість виявлена на локальному рівні: високі рівні мРНК *IL6* та *IL10* у пухлинній тканині асоціювалися зі збільшенням CD163⁺ -інфільтрації у 5,97 та 4,86 раза, а висока експресія *IL10* — також зі збільшенням CD68⁺ -клітин у 5,13 раза. Отже, попри відсутність чітких відмінностей цитокінів між більшістю клінічних груп, їх рівні були тісно пов'язані з формуванням мієлоїдного інфільтрату.

Синхронне підвищення рівня IL-6 та щільності обох макрофагальних субпопуляцій може відображати генералізовану активацію мієлоїдної ланки мікрооточення, оскільки цей цитокін продукується як пухлинними клітинами, так і макрофагами та фібробластами стромы. Акумуляція CD163⁺ -клітин на тлі високих концентрацій IL-6 узгоджується з експериментальними даними щодо здатності означеного інтерлейкіну потенціювати IL-4-індуковані програми альтернативної поляризації макрофагів шляхом синергічної взаємодії молекул STAT3, STAT6 і BATF. Водночас зафіксовані асоціації не дозволяють чітко визначити каузальний вектор: цитокіновий каскад може ініціювати рекрутування та функціональне перепрограмування моноцитів, проте самі ТАМ також виступають потужним

джерелом цих медіаторів. Зв'язок IL-10 переважно з CD163⁺ -популяцією відповідає його ролі у формуванні імунорегуляторних станів TAM. В експериментальній моделі PM3 саме макрофагальний IL-10 пригнічував продукцію IL-12 дендритними клітинами і послаблював CD8⁺ -Т-клітинну відповідь на хіміотерапію [26]. Водночас IL-10 не слід вважати специфічним індуктором M2-поляризації, оскільки його підвищення може бути наслідком функціонального стану різних клітин, включно з мастоцитами і регуляторними Т-лімфоцитами. Одержані результати доцільно інтерпретувати як свідчення існування макрофагально-цитокінової осі, а не як доказ прямого односпрямованого механізму.

Мастоцити також можуть бути залучені до цієї мережі. Вони здатні продукувати IL-6, IL-10, хемокіни і фактори росту, а їх активація може сприяти рекрутуванню макрофагів та ангіогенезу [39, 61]. У PM3 описані як прямі, так і обернені взаємозв'язки між представленістю MC і макрофагів, що залежали від просторового компартмента [62, 63]. Відсутність кореляції між зрілістю, кількістю та дегрануляцією мастоцитів у нашому дослідженні не виключає їх участі у цитокіновій регуляції, але свідчить, що для її підтвердження необхідне одночасне визначення клітинного джерела медіаторів і локальної секреції.

Таким чином, системні й локальні рівні IL-6 та IL-10 набувають найбільшої інформативності у поєднанні з морфологічною оцінкою імунної інфільтрації. Цитокінові показники не відтворювали повністю клінічну стратифікацію PM3, проте чітко відображали особливості макрофагального компонента. Це підтверджує доцільність комплексної оцінки гуморальних і клітинних маркерів мікрооточення замість використання окремого цитокіну як універсального показника агресивності.

Матрицелюлярна регуляція імунної компоненти пухлинного мікрооточення.

На відміну від структурних компонентів матриксу, матрицелюлярні протеїни виступають біологічними модуляторами клітинної адгезії, міграції, проліферації, міжклітинного сигналіngu, а також чутливості до цитокінів і факторів росту [72–75]. З огляду на це, коливання експресії *SPP1*/*OPN* та *SPARC*/*ON* за умов РМЗ доцільно інтерпретувати не як ізольовану характеристику малігнізованих клітин, а в ролі одного з ключових механізмів епігенетичної перебудови стромально-імунного мікрооточення. Біоінформатичний аналіз засвідчив підвищення експресії обох генів у тканині РМЗ порівняно з немалігнізованою тканиною молочної залози. При цьому для *SPP1* було характерне більш ніж п'ятикратне відносне підвищення, тоді як *SPARC* мав вищий абсолютний рівень транскрипції. Водночас у загальній когорті TCGA експресія цих генів не демонструвала послідовної залежності від клінічної стадії. Це свідчить, що їх підвищення, ймовірно, відображає сам факт пухлинної трансформації та ремоделювання мікрооточення, але не є універсальним показником поширеності процесу.

У власній когорті встановлено більш диференційовані закономірності. Експресія мРНК *SPP1* і *SPARC* зростала у пухлинах категорії T2 відповідно у 1,7 та 1,6 раза, а за наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів — у 2,6 та 1,5 раза. Найбільш виражене підвищення обох генів спостерігали при базальному молекулярному підтипі. На рівні білка *OPN* і *ON* не залежали від розміру первинної пухлини, проте їх експресія була вищою при N⁺, низькому ступені диференціювання та базальному підтипі РМЗ. Розбіжність між транскриптним і білковим рівнями може бути наслідком посттранскрипційної регуляції, різної стабільності мРНК і протеїнів, секреції матрицелюлярних молекул, а також неоднакового внеску пухлинних і стромальних клітин у сумарний тканинний показник.

Важливим результатом стала виражена топологічна гетерогенність досліджених протеїнів. OPN виявляли у цитоплазмі та ядрах пухлинних клітин, у стромальних елементах і прилеглих адипоцитах, тоді як ON локалізувався у цитоплазмі злоякісно трансформованих клітин, фібробластах, макрофагах і стромі. Ядерна локалізація OPN частіше спостерігалася у N^+ - пухлинах, низькодиференційованому PM3, новоутвореннях із високою проліферативною активністю та відсутністю ER і PR. Отже, біологічне значення OPN може визначатися не лише загальною інтенсивністю експресії, а й його внутрішньоклітинним розподілом. Водночас механізм ядерної локалізації у цій роботі не досліджувався, тому її слід розглядати як морфологічну ознаку агресивнішого фенотипу, а не як доведений причинний чинник.

Найбільш переконливо імунорегуляторний потенціал OPN виявився у його взаємозв'язку з макрофагальною інфільтрацією пухлини. За умов високої стромальної експресії OPN чисельність $CD163^+$ -макрофагів перевищувала аналогічний показник у 2,17 раза, тоді як щільність $CD68^+$ - клітин була у 2,06 раза нижчою, що супроводжувалося статистично значущим падінням коефіцієнта $CD68^+ / CD163^+$. Оскільки $CD68$ є маркером загального макрофагального пулу, а $CD163$ відображає насамперед M2-поляризований стан клітин, означену тенденцію доцільно інтерпретувати як відносне збагачення мікрооточення субпопуляцією $CD163^+$, аніж як пряму фенотипову трансдиференціацію макрофагів із M1- у M2-стан. Виявлена закономірність узгоджується з літературними даними про здатність OPN взаємодіяти з інтегриновими рецепторами та $CD44$, регулювати міграцію і виживання клітин, сприяти рекрутуванню макрофагів та разом з іншими сигналами підтримувати M2-подібні функціональні програми [76–80]. Значення осі $SPP1$ – $CD44$ підтверджене також результатами одноклітинного аналізу тричі-негативного PM3, де посилена взаємодія $SPP1^+$ -макрофагів із $CD44^+$ -пухлинними клітинами була пов'язана з формуванням хіміорезистентності [81]. Таким чином, власні результати доповнюють ці

дані, демонструючи зв'язок саме стромальної експресії OPN зі зміною фенотипового складу макрофагальної інфільтрації.

Одержані дані також дозволили розширити уявлення про участь OPN у регуляції мастоцитарної ланки мікрооточення. Висока експресія OPN у пухлинних клітинах супроводжувалася збільшенням інтратуморальної кількості мастоцитів у 2,48 раза та одночасним зниженням їх стромальної субпопуляції у 2,86 раза. Це може відображати не загальне рекрутування клітин, а їх перерозподіл зі стромального компартменту до пухлинної паренхіми. Натомість висока стромальна експресія OPN асоціювалася зі збільшенням загальної кількості мастоцитів у 2,36 раза та стромальної субпопуляції — у 3,32 раза, що може свідчити про участь OPN у їх накопиченні або утриманні в мікрооточенні.

Особливо важливим є те, що OPN був пов'язаний не лише з кількістю і локалізацією мастоцитів, а й з їх функціональним станом. За високої паренхіматозної експресії OPN у тканині РМЗ активність дегрануляції підвищувалася на 54,38%, а за високої стромальної — на 101%. Найбільш виражені асоціації стромального OPN із мастоцитарною інфільтрацією виявляли у N⁺-пухлинах, новоутвореннях G3, а також у люмінальному В і базальному підтипах. Оскільки біологічна роль мастоцитів залежить від їх просторової локалізації, ступеня дегрануляції та спектра вивільнених медіаторів [30, 31, 36–47], отримані результати свідчать про можливий зв'язок OPN із формуванням функціонально активного мастоцитарного компонента. Дегранульовані мастоцити можуть впливати на ангіогенез, проникність судин, протеоліз і ремоделювання матриксу, створюючи умови для інвазії та метастазування. Водночас проведені дослідження мало асоціативний характер і не доводять прямого хемотаксичного або активувального впливу OPN на мастоцити.

Отримані закономірності мають експериментальне обґрунтування. Nagasaka et al. показали, що OPN продукується мастоцитами та здатний посилювати їх міграцію і IgE-залежну дегрануляцію за участю CD44 та α v-

інтегрину, що узгоджується з виявленим нами зв'язком високої експресії OPN із перерозподілом і функціональною активацією мастоцитів [132]. Водночас Ng et al. встановили, що іммобілізований у матриксі OPN посилює адгезію мастоцитів людини, але модифікує їх цитокінову секрецію. Це свідчить про залежність ефектів OPN від його фізичної форми та мікроанатомічної локалізації і може пояснювати різноспрямовані асоціації паренхіматозної та стромальної експресії цього протеїну з топологією і функціональним станом мастоцитів [133].

На відміну від OPN, для стромальної експресії ON не встановлено статистично значущого зв'язку з кількістю CD68⁺ - або CD163⁺ -макрофагів. Водночас експресія ON була підвищена при метастатичному ураженні лімфатичних вузлів, низькому ступені диференціювання та базальному підтипі. Це дозволяє припустити, що *SPARC*/ON впливає на імунну компоненту переважно опосередковано — через організацію позаклітинного матриксу, активність фібробластів, адгезію, ангіогенез і протеолітичні процеси. Така інтерпретація відповідає контекст-залежній ролі *SPARC*: напрям його ефекту може змінюватися залежно від клітинного джерела, локалізації, протеолітичного процесингу та молекулярного підтипу пухлини [84–93]. Відсутність асоціацій із двома дослідженими макрофагальними маркерами не виключає інших імунорегуляторних механізмів ON, які не були охоплені проведеним аналізом.

Результати аналізу виживаності додатково підкреслюють відмінності між OPN і ON. У власній когорті високий рівень *SPP1* на рівні мРНК та OPN на рівні білка асоціювався зі зниженням п'ятирічної загальної виживаності відповідно на 22,0 і 30,0%, тоді як для *SPARC*/ON статистично значущих відмінностей не встановлено. Водночас у загальній когорті TCGA експресія жодного з генів не була достовірно пов'язана із загальною виживаністю. Такі розбіжності можуть бути зумовлені різним стадійним складом вибірок, методами визначення, порогоми поділу на групи, тривалістю спостереження та неможливістю розмежувати внесок пухлинних і стромальних клітин у

масивних транскриптомних даних. Тому OPN можна розглядати як потенційний маркер несприятливого перебігу, однак його незалежне прогностичне значення потребує підтвердження у більшій когорті та багатофакторному аналізі.

Отже, констатовані дані свідчать, що OPN виступає ключовим молекулярним медіатором між матрицелюлярним та імунним сегментами мікрооточення РМЗ. Його стромальна локалізація корелює з відносним збагаченням тканини CD163⁺-макрофагами, тоді як паренхіматозна та стромальна експресія чинять дивергентний вплив на просторову архітектуру мастоцитів та інтенсифікацію їхнього екзоцитозу. Для SPARC (ON), навпаки, превалюють асоціації з клінічною агресивністю карциноми та десмопластичною перебудовою строми за відсутності прямої кореляції з дослідженими макрофагальними параметрами.

МікроРНК як посттранскрипційна ланка регуляції стромально-імунних взаємодій.

МікроРНК здатні одночасно модулювати численні гени-мішені та сигнальні шляхи, впливаючи на проліферацію пухлинних клітин, цитокінову відповідь, рекрутування і функціональний стан імунних клітин та ремоделювання позаклітинного матриксу. Біоінформатичний аналіз показав, що miR-26a-5p, miR-155-5p і miR-18a-5p мають як спільні, так і специфічні регуляторні мережі. Серед їх потенційних мішеней виявлено *IL6*, *ICAM1*, *PTEN*, *WNT5A*, *TGFBR2*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4* і *THBS1*, залучені до запальної відповіді, PI3K/AKT- і TGF- β -залежного сигналінгу, ангиогенезу та регуляції міелоїдних клітин.

Найбільш виражені імунні асоціації встановлено для miR-155-5p. За даними ImmReg її експресія прямо корелювала із загальною інфільтрацією макрофагів, M1-подібними макрофагами, моноцитами, В- і CD4⁺-Т-лімфоцитами, нейтрофілами та регуляторними Т-клітинами, але обернено — з M2-подібними макрофагами і мастоцитами. Це відповідає контекст-залежній ролі miR-155, яка у пухлинних клітинах може проявляти онкогенні

властивості через пригнічення SOCS1, тоді як в імунних клітинах — посилювати протипухлинну відповідь [102, 103].

У TCGA-BRCA експресія hsa-mir-155 була підвищена у пухлинній тканині, особливо при тричі-негативному РМЗ. У власній когорті значущих відмінностей miR-155-5p між молекулярними підтипами не виявлено, однак її рівень був нижчим у N⁺ -пухлинах. Такі розбіжності можуть бути пов'язані з аналізом різних молекулярних форм мікроРНК, відмінностями клінічних вибірок і внеском різних клітинних популяцій у сумарну тканинну експресію.

Для miR-26a-5p визначено потенційні мішені у NF-κB-, PI3K/АКТ- і TGF-β-залежних мережах. За літературними даними miR-26a може пригнічувати IL-6, знижувати продукцію M-CSF пухлинними клітинами та обмежувати рекрутування макрофагів, хоча напрям її впливу залежить від тканинного контексту [104–107]. У власному матеріалі підвищена експресія miR-26a-5p асоціювалася з N⁺, HER2-позитивним статусом і Ki-67 > 14%, що може відображати її участь у HER2-залежних програмах або компенсаторній регуляторній відповіді.

miR-18a-5p за даними ImmReg прямо асоціювалася з M1-подібними та обернено — з M2-подібними макрофагами, мастоцитами і нейтрофілами. Вона виявляється у стромі ER-негативних пухлин і CD68⁺ -клітинах, а її перенесення пухлинними позаклітинними везикулами може активувати STAT3, підвищувати PD-L1 у макрофагах і підтримувати імуносупресивний стан [108–110].

У TCGA-BRCA hsa-mir-18a була підвищена у тканині РМЗ, особливо при тричі-негативному та медулярному варіантах. У власній когорті рівень miR-18a-5p був у 2,03 раза вищим при протоковій карциномі порівняно з часточковою, але не залежав від T, N, стадії, G, рецепторного статусу або Ki-67. Це свідчить, що її експресія може більшою мірою відображати гістогенез і тканинну організацію пухлини, ніж поширеність процесу.

Отже, досліджені мікроРНК формують додатковий регуляторний рівень стромально-імунного мікрооточення. miR-155-5p найбільш тісно пов'язана із загальним імунним інфільтратом, miR-26a-5p — з NF-κB/IL-6- і CSF1-залежними механізмами, HER2-позитивністю та проліферацією, а miR-18a-5p — з макрофагальним сигналінгом і гістологічним типом РМЗ. Їх функціональне значення необхідно оцінювати з урахуванням клітинного джерела, молекулярного підтипу та стадії захворювання.

Інтегральне значення досліджених компонентів для формування агресивного фенотипу РМЗ.

Одержані результати дозволяють розглядати стромально-імунне мікрооточення РМЗ як багаторівневу систему, де агресивний фенотип формується через узгоджені зміни клітинних, гуморальних, матрицелюлярних і посттранскрипційних механізмів. Прогресування пухлинного процесу супроводжувалося зростанням CD68⁺-макрофагальної інфільтрації, тоді як низький ступінь диференціювання та базальний підтип характеризувалися відносним накопиченням CD163⁺-клітин. Мастоцитарна ланка відзначалася змінами кількості, топології, дегрануляції та зрілості клітин залежно від клініко-біологічних характеристик пухлини.

IL-6 та IL-10 не забезпечували самостійної стратифікації більшості клінічних груп, однак їх високі рівні асоціювалися зі збільшенням CD163⁺-популяції. Це свідчить про функціонування самопідтримувальної мережі, у якій пухлинні та стромальні клітини продукують медіатори, які рекрутують і перепрограмують макрофаги, а TAM підтримують прозапальний та імуносупресивний стан мікрооточення [18, 24, 26, 97, 98].

Матрицелюлярні протеїни виступали регуляторами клітинно-матриксної комунікації. Висока стромальна експресія OPN асоціювалася з відносним переважанням CD163⁺-макрофагів. Висока експресія OPN у пухлинних клітинах супроводжувалася збільшенням інтратуморальної кількості мастоцитів у 2,48 раза та зниженням їх стромальної субпопуляції у 2,86 раза, що може відображати внутрішньопухлинний перерозподіл клітин.

Висока стромальна експресія OPN асоціювалася зі збільшенням загальної та стромальної кількості мастоцитів у 2,36 та 3,32 раза. Незалежно від топології, високий рівень OPN супроводжувався посиленням дегрануляції мастоцитів на 54,38 і 101%, що вказує на його можливу участь у міграції та функціональній активації цих клітин.

Рівень експресії *SPARC/ON* не демонстрував прямої залежності від досліджених макрофагальних параметрів, проте його зростання за умов категорій N^+ , G3 та базального підтипу PM3 відображало інтенсивність десмопластичного ремоделювання строми. МікроРНК доповнювали архітектоніку цієї системи шляхом посттранскрипційного контролю цитокінового сигналіngu, клітинної адгезії та TGF- β -залежних патогенетичних шляхів. Кореляція miR-26a-5p із метастатичним ураженням лімфовузлів (N^+), HER2-позитивністю та високим проліферативним індексом Ki-67, паралельно із депресією miR-155-5p при N^+ та акумуляцією miR-18a-5p у протокових карциномах, сукупно свідчать про високу гетерогенність та специфічність епігенетичних регуляторних механізмів. Отже, ступінь злоякісності PM3 визначається не окремим маркером, а поєднанням змін макрофагальної та мастоцитарної інфільтрації, цитокінового профілю, експресії OPN/ON і мікроРНК. Найбільш чітке прогностичне значення встановлено для SPP1/OPN. Перспективнішою є комплексна оцінка клітинних, молекулярних і топологічних характеристик мікрооточення.

Сукупність отриманих даних було узагальнено у багаторівневій моделі представлений на Рис. 7.1.

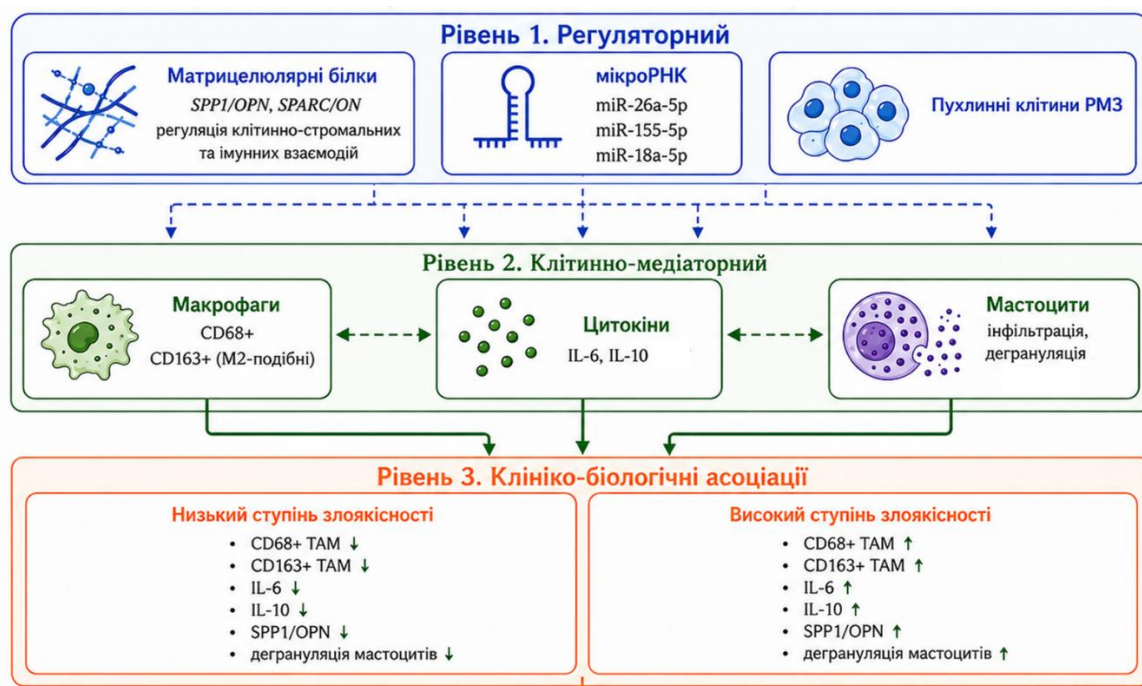


Рис. 7.1 Багаторівнева модель взаємозв'язку компонентів стромально-імунного мікрооточення з агресивністю РМЗ

Запропонована модель має три рівні. Перший — регуляторний, до якого належать пухлинні клітини, матрицелюлярні білки *SPP1/OPN* і *SPARC/ON* та регуляторні мікроРНК. Ці компоненти формують молекулярне середовище пухлини й можуть визначати характер взаємодії між її стромальними та імунними клітинами. МікроРНК miR-26a-5p, miR-155-5p і miR-18a-5p включено до моделі, оскільки вони потенційно регулюють гени, пов'язані із запальною відповіддю, залученням і функціональним станом імунних клітин та ремоделюванням позаклітинного матриксу.

Другий рівень — клітинно-медіаторний: CD68-позитивні та CD163-позитивні макрофаги, цитокіни IL-6, IL-10, а також МС з урахуванням їх інфільтрації й дегрануляції.

Третій рівень відображає клініко-біологічні асоціації. Менш агресивний патерн характеризувався T1, N0, G1–G2, люмінальним А підтипом та нижчими показниками проліферації й активації мікрооточення. Більш агресивний патерн поєднував T2, N-позитивний статус, G3, базальний

або HER2-позитивний фенотип із підвищенням Ki-67, макрофагальної інфільтрації, цитокінових показників, OPN та дегрануляції мастоцитів.

ВИСНОВКИ

Отримані результати дозволили сформуванню комплексного уявлення про стромально-імунне мікрооточення РМЗ як інтегровану систему взаємодії імунних клітин, матрицелюлярних білків, цитокінів та регуляторних мікроРНК, асоційовану з агресивністю пухлинного процесу. Встановлено, що особливості інфільтрації пухлинно-асоційованими макрофагами і мастоцитами, експресія OPN, ON, цитокінів та регуляторних мікроРНК є взаємопов'язаними компонентами пухлинного мікрооточення, які відображають біологічні особливості перебігу захворювання. Результати дослідження поглиблюють сучасні уявлення про молекулярні механізми формування імуносупресивного мікрооточення РМЗ та створюють підґрунтя для впровадження комплексних молекулярно-генетичних і епігенетичних біомаркерів оцінки агресивності пухлинного процесу, прогнозування перебігу захворювання та персоналізації лікування.

1 З'ясовано особливості топології та функціональну активність мастоцитів у тканині РМЗ. Встановлено, що висока інтратуморальна інфільтрація мастоцитами є характерною ознакою пухлин категорії T1 (у 1,9 раза порівняно з T2; $p=0,037$), тоді як у РМЗ категорії T2 відзначається збільшенням їх функціональної активності, про що свідчить вищий на 28,0% індекс дегрануляції ($p=0,029$). Метастатичне ураження регіонарних лімфатичних вузлів супроводжується збільшенням стромальної інфільтрації мастоцитами на 45,1% ($p=0,017$) та зростанням індексу їх дегрануляції у 1,23 раза. Низькодиференційовані пухлини (G3) характеризуються достовірним зниженням загальної та інтратуморальної інфільтрації мастоцитами ($p=0,049$ та $p=0,021$ відповідно) на тлі підвищення їх стромальної локалізації ($p=0,042$) і функціональної активності. Найвищі показники інфільтрації мастоцитів зафіксовано у РМЗ люмінального Б та базального молекулярних підтипів ($p<0,05$), що характеризуються високою проліферативною активністю (високі показники експресії Ki-67).

2. Встановлено, що рівень інфільтрації CD68⁺ макрофагами тканини РМЗ прямо корелює зі стадією захворювання ($p=0,026$), наявністю метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах ($p=0,047$) та базальним ($p=0,010$) молекулярним підтипом новоутворень. Доведено наявність зв'язку між рівнем інфільтрації CD163⁺ клітинами та ступенем диференціювання ($p=0,024$) і рецепторним статусом РМЗ ($p=0,033$, $p=0,012$, $p=0,004$ відповідно для ER, PR, HER2/neu). Зниження співвідношення CD68⁺ /CD163⁺ у пухлинах базального молекулярного підтипу ($1,192 \pm 0,117$; $p=0,027$) та низького ступеня диференціювання ($1,289 \pm 0,153$; $p=0,045$) свідчить про переважання М2-поляризованих макрофагів у тканині РМЗ високого ступеня злоякісності.

3. Показано, що висока експресія OPN у стромальному компоненті РМЗ асоціюється із зростанням загальної інфільтрації мастоцитів у хворих з метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів (на 35,2%) та у новоутвореннях низького ступеня диференціювання (на 38,2%). У пухлинах люмінального Б і базального молекулярних підтипів висока експресія OPN у стромальному компоненті ($Me=1,650$ у.о.) пухлинного вогнища асоціювалася зі збільшенням загальної кількості мастоцитів на 24,8% та 37% відповідно порівняно з пухлинами з низькою експресією цього протеїну ($p<0,05$). В той час, підвищення показників експресії OPN у паренхіматозній компоненті РМЗ за наявності метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів прямо корелювало з рівнем інтратуморальної інфільтрації мастоцитами ($p<0,05$). Достовірно більші показники експресії miR-155-5p (в 3,3 рази ($p<0,05$)) зафіксовано у тканині РМЗ із підвищеним індексом дегрануляції мастоцитів.

4. Встановлено, що високий рівень IL-6 (більше 28,04 пг/мл) у сироватці крові та підвищена експресія мРНК *IL10* у пухлинній тканині асоціювалися зі збільшенням кількості CD68⁺ пухлиноасоційованих макрофагів ($p=0,0159$ та $p=0,0316$ відповідно). Водночас кількість CD163⁺ макрофагів була вищою за умов високих рівнів IL-6 і IL-10 (більше 2,68

пг/мл) у сироватці крові ($p=0,0286$ та $p=0,0357$ відповідно), а також за підвищеної експресії мРНК *IL6* та *IL10* у пухлинній тканині ($p<0,05$). З'ясовано, що експресія *miR-155-5p* прямо корелює з вмістом М1-подібних макрофагів ($r=0,689$; $p=1,817\times 10^{-16}$) та обернено — з вмістом М2-подібних макрофагів ($r=-0,391$; $p=2,454\times 10^{-4}$). Аналогічні зв'язки виявлено для *miR-18a-5p*: прямий із вмістом М1-подібних ($r=0,335$; $p=1,825\times 10^{-32}$) та обернений — із рівнем інфільтрації М2-подібних макрофагів ($r=-0,305$; $p=9,254\times 10^{-27}$) у пухлинному мікрооточенні РМЗ.

5. На підставі комплексного дослідження компонентів стромально-імунного мікрооточення ідентифіковано патерн експресії молекулярно-генетичних та епігенетичних біомаркерів (ON, OPN, IL-6, IL-10, *miR-155-5p*, *miR-18a-5p*, показники інфільтрації CD68⁺, CD163⁺ макрофагами та мастоцитами), що може бути використаний для поглибленої характеристики та оцінки ступеня злоякісності РМЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sung H., Filho A. M., Laversanne M., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 34 cancers in 186 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2026. Published online 8 July 2026. DOI: 10.3322/caac.70090.
2. Brook N., Brook E., Dharmarajan A., Dass C. R., Chan A. Breast cancer bone metastases: pathogenesis and therapeutic targets. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2018. Vol. 96. P. 63–78. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.01.003>.
3. Gerstberger S., Jiang Q., Ganesh K. Metastasis. *Cell*. 2023. Vol. 186, no. 8. P. 1564–1579. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.003>.
4. Wu S. Z., Al-Eryani G., Roden D. L. et al. A single-cell and spatially resolved atlas of human breast cancers. *Nat. Genet.* 2021. Vol. 53, no. 9. P. 1334–1347. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00911-1>.
5. Loibl S., André F., Bachelot T. et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2024. Vol. 35, no. 2. P. 159–182. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2023.11.016>.
6. Kosorok M. R., Laber E. B. Precision medicine. *Annu. Rev. Stat. Appl.* 2019. Vol. 6. P. 263–286. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-statistics-030718-105251>.
7. Garattini L., Curto A., Freemantle N. Personalized medicine and economic evaluation in oncology: all theory and no practice? *Expert Rev. Pharmacoecon. Outcomes Res.* 2015. Vol. 15, no. 5. P. 733–738. DOI: <https://doi.org/10.1586/14737167.2015.1078239>.
8. Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism*. 2015. Vol. 64, no. 3, suppl. 1. P. S16–S21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.027>.

9. Su M., Zhang Z., Zhou X. et al. Proteomics, personalized medicine and cancer. *Cancers*. 2021. Vol. 13, no. 11. Art. 2512. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13112512>.
10. Hanahan D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discov*. 2022. Vol. 12, no. 1. P. 31–46. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.
11. Wang Q., Shao X., Zhang Y. Role of tumor microenvironment in cancer progression and therapeutic strategy. *Cancer Med*. 2023. Vol. 12. P. 11149–11165. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.5698>.
12. Pein M., Oskarsson T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2015. Vol. 309, no. 10. P. C627–C638. DOI: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00145.2015>.
13. Oskarsson T. Extracellular matrix components in breast cancer progression and metastasis. *Breast*. 2013. Vol. 22, suppl. 2. P. S66–S72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.012>.
14. Bejarano L., Jordão M. J. C., Joyce J. A. Therapeutic targeting of the tumor microenvironment. *Cancer Discov*. 2021. Vol. 11, no. 4. P. 933–959. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1808>.
15. Sabit H., Arneth B., Abdel-Ghany S. et al. Beyond cancer cells: how the tumor microenvironment drives cancer progression. *Cells*. 2024. Vol. 13, no. 19. Art. 1666. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells13191666>.
16. Brassart-Pasco S., Brézillon S., Brassart B. et al. Tumor microenvironment: extracellular matrix alterations influence tumor progression. *Front. Oncol*. 2020. Vol. 10. Art. 397. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00397>.
17. Danenberg E., Bardwell H., Zanutelli V. R. T. et al. Breast tumor microenvironment structures are associated with genomic features and clinical outcome. *Nat. Genet*. 2022. Vol. 54, no. 5. P. 660–669. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01041-y>.
18. Tiwari A., Trivedi R., Lin S. Y. Tumor microenvironment: barrier or opportunity towards effective cancer therapy. *J. Biomed. Sci*. 2022. Vol. 29, no. 1. Art. 83. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12929-022-00866-3>.

19. Boelens M. C., Wu T. J., Nabet B. Y. et al. Exosome transfer from stromal to breast cancer cells regulates therapy resistance pathways. *Cell*. 2014. Vol. 159, no. 3. P. 499–513. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.051>.
20. Risom T., Glass D. R., Averbukh I. et al. Transition to invasive breast cancer is associated with progressive changes in the structure and composition of tumor stroma. *Cell*. 2022. Vol. 185, no. 2. P. 299–310.e18. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.023>.
21. Yang J., Bahcecioglu G., Zorlutuna P. The extracellular matrix and vesicles modulate the breast tumor microenvironment. *Bioengineering*. 2020. Vol. 7, no. 4. Art. 124. DOI: <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040124>.
22. Tan Z., Kan C., Sun M. et al. Mapping breast cancer microenvironment through single-cell omics. *Front. Immunol.* 2022. Vol. 13. Art. 868813. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.868813>.
23. Laviron M., Petit M., Weber-Delacroix E. et al. Tumor-associated macrophage heterogeneity is driven by tissue territories in breast cancer. *Cell Rep.* 2022. Vol. 39, no. 8. Art. 110865. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110865>.
24. Korkaya H., Kim G. I., Davis A. et al. Activation of an IL6 inflammatory loop mediates trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer by expanding the cancer stem cell population. *Mol. Cell*. 2012. Vol. 47, no. 4. P. 570–584. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.014>.
25. Cho H. Y., Choi J. H., Kim K. J., Shin M., Choi J. W. Microfluidic system to analyze the effects of interleukin 6 on lymphatic breast cancer metastasis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. Vol. 8. Art. 611802. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.611802>.
26. Ruffell B., Chang-Strachan D., Chan V. et al. Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell*. 2014. Vol. 26, no. 5. P. 623–637. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.09.006>.

27. Coffelt S. B., Kersten K., Doornebal C. W. et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2015. Vol. 522, no. 7556. P. 345–348. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature14282>.
28. Spiegel A., Brooks M. W., Houshyar S. et al. Neutrophils suppress intraluminal NK cell-mediated tumor cell clearance and enhance extravasation of disseminated carcinoma cells. *Cancer Discov*. 2016. Vol. 6, no. 6. P. 630–649. DOI: <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1157>.
29. Kundu M., Butti R., Panda V. K. et al. Modulation of the tumor microenvironment and mechanism of immunotherapy-based drug resistance in breast cancer. *Mol. Cancer*. 2024. Vol. 23, no. 1. Art. 92. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-024-01990-4>.
30. Majorini M. T., Colombo M. P., Lecis D. Few, but efficient: the role of mast cells in breast cancer and other solid tumors. *Cancer Res*. 2022. Vol. 82, no. 8. P. 1439–1447. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-21-3424>.
31. Ligan C., Ma X. H., Zhao S. L., Zhao W. The regulatory role and mechanism of mast cells in tumor microenvironment. *Am. J. Cancer Res*. 2024. Vol. 14, no. 1. P. 1–15. DOI: <https://doi.org/10.62347/ezst5505>.
32. Dvorak A. M., Massey W., Warner J. et al. IgE-mediated anaphylactic degranulation of isolated human skin mast cells. *Blood*. 1991. Vol. 77, no. 3. P. 569–578.
33. Dvorak A. M., Kissell S. Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovery during wound healing in situ. *J. Leukoc. Biol*. 1991. Vol. 49, no. 2. P. 197–210. DOI: <https://doi.org/10.1002/jlb.49.2.197>.
34. Irani A. M., Bradford T. R., Kepley C. L. et al. Detection of MC χ and MC $\chi\chi$ types of human mast cells by immunohistochemistry using new monoclonal anti-tryptase and anti-chymase antibodies. *J. Histochem. Cytochem*. 1989. Vol. 37, no. 10. P. 1509–1515. DOI: <https://doi.org/10.1177/37.10.2674273>.

35. Toru H., Eguchi M., Matsumoto R. et al. Interleukin-4 promotes the development of tryptase and chymase double-positive human mast cells accompanied by cell maturation. *Blood*. 1998. Vol. 91, no. 1. P. 187–195.
36. Coussens L. M. et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*. 1999. Vol. 13, no. 11. P. 1382–1397. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.13.11.1382>.
37. Wernersson S., Pejler G. Mast cell secretory granules: armed for battle. *Nat. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 14, no. 7. P. 478–494. DOI: <https://doi.org/10.1038/nri3690>.
38. Aponte-López A. et al. Mast cell, the neglected member of the tumor microenvironment: role in breast cancer. *J. Immunol. Res.* 2018. Vol. 2018. Art. 2584243. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/2584243>.
39. Moon T. C. et al. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 2010. Vol. 3, no. 2. P. 111–128. DOI: <https://doi.org/10.1038/mi.2009.136>.
40. Samoszuk M., Kanakubo E., Chan J. K. Degranulating mast cells in fibrotic regions of human tumors and evidence that mast cell heparin interferes with the growth of tumor cells through a mechanism involving fibroblasts. *BMC Cancer*. 2005. Vol. 5. Art. 121. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-5-121>.
41. Jiang Y. et al. Mast cell chymase affects the proliferation and metastasis of lung carcinoma cells in vitro. *Oncol. Lett.* 2017. Vol. 14, no. 3. P. 3193–3198. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6487>.
42. Rajput A. B., Turbin D. A., Cheang M. C. U. et al. Stromal mast cells in invasive breast cancer are a marker of favourable prognosis: a study of 4,444 cases. *Breast Cancer Res. Treat.* 2008. Vol. 107, no. 2. P. 249–257. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9546-3>.
43. Xiang M., Gu Y., Zhao F., Lu H., Chen S., Yin L. Mast cell tryptase promotes breast cancer migration and invasion. *Oncol. Rep.* 2010. Vol. 23, no. 3. P. 615–619. DOI: https://doi.org/10.3892/or_00000676.

44. Ribatti D., Annese T., Tamma R. Controversial role of mast cells in breast cancer tumor progression and angiogenesis. *Clin. Breast Cancer*. 2021. Vol. 21, no. 6. P. 486–491. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clbc.2021.08.010>.
45. Galli S. J., Tsai M. IgE and mast cells in allergic disease. *Nat. Med.* 2012. Vol. 18, no. 5. P. 693–704. DOI: <https://doi.org/10.1038/nm.2755>.
46. Eissmann M. F., Buchert M., Ernst M. IL33 and mast cells—the key regulators of immune responses in gastrointestinal cancers? *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. Art. 1389. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01389>.
47. Mangia A, Malfettone A, Rossi R, Paradiso A, Ranieri G, Simone G, Resta L. Tissue remodelling in breast cancer: human mast cell tryptase as an initiator of myofibroblast differentiation. *Histopathology*. 2011;58(7):1096–1106. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03842.x.
48. Munir M. T., Kay M. K., Kang M. H. et al. Tumor-associated macrophages as multifaceted regulators of breast tumor growth. *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, no. 12. Art. 6526. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22126526>.
49. Malfitano A. M., Pisanti S., Napolitano F. et al. Tumor-associated macrophage status in cancer treatment. *Cancers*. 2020. Vol. 12, no. 7. Art. 1987. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12071987>.
50. Pan Y., Yu Y., Wang X., Zhang T. Tumor-associated macrophages in tumor immunity. *Front. Immunol.* 2020. Vol. 11. Art. 583084. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583084>.
51. Stavrou M., Constantinidou A. Tumor associated macrophages in breast cancer progression: implications and clinical relevance. *Front. Immunol.* 2024. Vol. 15. Art. 1441820. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1441820>.
52. Kumari N., Choi S. H. Tumor-associated macrophages in cancer: recent advancements in cancer nanoimmunotherapies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022. Vol. 41, no. 1. Art. 68. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02272-x>.
53. Ji Z. Z., Chan M. K.-K., Chan A. S.-W. et al. Tumour-associated macrophages: versatile players in the tumour microenvironment. *Front. Cell Dev. Biol.*

2023. Vol. 11. Art. 1261749. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1261749>.
54. Elfstrum A. K. et al. Defining and targeting macrophage heterogeneity in the mammary gland and breast cancer. *Cancer Med.* 2024. Vol. 13, no. 3. Art. e7053. DOI: <https://doi.org/10.1002/cam4.7053>.
 55. Zhang Q. W., Liu L., Gong C. Y. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 2012. Vol. 7, no. 12. Art. e50946. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050946>.
 56. Wang C., Lin Y., Zhu H. et al. The prognostic and clinical value of tumor-associated macrophages in patients with breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Front. Oncol.* 2022. Vol. 12. Art. 905846. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.905846>.
 57. Mei J., Xiao Z., Guo C. et al. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, no. 23. P. 34217–34228. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9079>.
 58. Yuan X., Zhang J., Li D. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol. Oncol.* 2017. Vol. 147, no. 1. P. 181–187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.07.007>.
 59. Tiainen S., Tumelius R., Rilla K. et al. High numbers of macrophages, especially M2-like (CD163-positive), correlate with hyaluronan accumulation and poor outcome in breast cancer. *Histopathology.* 2015. Vol. 66, no. 6. P. 873–883. DOI: <https://doi.org/10.1111/his.12607>.
 60. Mahmoud S. M. A., Lee A. H. S., Paish E. C. et al. Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2012. Vol. 65, no. 2. P. 159–163. DOI: <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200355>.
 61. Eissmann M. F., Dijkstra C., Jarnicki A. et al. IL-33-mediated mast cell activation promotes gastric cancer through macrophage mobilization. *Nat.*

- Commun. 2019. Vol. 10, no. 1. Art. 2735. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10676-1>.
62. Kwon G. Y., Lee S. D., Park E. S. Mast cell and macrophage counts and microvessel density in invasive breast carcinoma—comparison analysis with clinicopathological parameters. *Cancer Res. Treat.* 2005. Vol. 37, no. 2. P. 103–108. DOI: <https://doi.org/10.4143/crt.2005.37.2.103>.
 63. Dabiri S., Huntsman D., Makretsov N. et al. The presence of stromal mast cells identifies a subset of invasive breast cancers with a favorable prognosis. *Mod. Pathol.* 2004. Vol. 17, no. 6. P. 690–695. DOI: <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800094>.
 64. Ueno T., Toi M., Saji H. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* 2000. Vol. 6, no. 8. P. 3282–3289.
 65. Rodríguez-Bejarano O. H., Parra-López C., Patarroyo M. A. A review concerning the breast cancer-related tumour microenvironment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2024. Vol. 199. Art. 104389. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2024.104389>.
 66. Li R., Wang Y., Xie M. Tumor microenvironment and key signaling pathways in breast cancer progression and therapy resistance: a review. *Biomol. Biomed.* 2026. Vol. 26, no. 9. P. 1461–1475. DOI: <https://doi.org/10.17305/bb.2026.13708>.
 67. Sharma M., Kumar U., Singh S. Tumor microenvironment in breast cancer: cellular crosstalk, pathways, and therapeutic insights. *Mol. Biol. Rep.* 2025. Vol. 53, no. 1. Art. 41. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11033-025-11231-6>.
 68. Carter J. M., Chumsri S., Hinerfeld D. A. et al. Distinct spatial immune microlandscapes are independently associated with outcomes in triple-negative breast cancer. *Nat. Commun.* 2023. Vol. 14, no. 1. Art. 2215. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37806-0>.
 69. Zhang C., Liu W., Yang P. et al. Dual roles of innate immune cells and cytokines in shaping the breast cancer microenvironment. *Front. Immunol.*

2025. Vol. 16. Art. 1654947. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1654947>.
70. Dekker Y., Le Dévédec S. E., Danen E. H. J., Liu Q. Crosstalk between hypoxia and extracellular matrix in the tumor microenvironment in breast cancer. *Genes*. 2022. Vol. 13, no. 9. Art. 1585. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes13091585>.
71. Liu Q., Peng F., Chen J. The role of exosomal microRNAs in the tumor microenvironment of breast cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, no. 16. Art. 3884. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20163884>.
72. Bornstein P., Sage E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002. Vol. 14, no. 5. P. 608–616. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(02\)00361-7](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(02)00361-7).
73. Murphy-Ullrich J. E., Sage E. H. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biol.* 2014. Vol. 37. P. 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.07.005>.
74. Wong G. S., Rustgi A. K. Matricellular proteins: priming the tumour microenvironment for cancer development and metastasis. *Br. J. Cancer*. 2013. Vol. 108, no. 4. P. 755–761. DOI: <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.592>.
75. Lepucki A., Orlińska K., Mielczarek-Palacz A. et al. The role of extracellular matrix proteins in breast cancer. *J. Clin. Med.* 2022. Vol. 11, no. 5. Art. 1250. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm11051250>.
76. Panda V. K., Mishra B., Nath A. N. et al. Osteopontin: a key multifaceted regulator in tumor progression and immunomodulation. *Biomedicines*. 2024. Vol. 12, no. 7. Art. 1527. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines12071527>.
77. Yan Z., Hu X., Tang B., Deng F. Role of osteopontin in cancer development and treatment. *Heliyon*. 2023. Vol. 9, no. 10. Art. e21055. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21055>.

78. Icer M. A., Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin. Biochem.* 2018. Vol. 59. P. 17–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.07.003>.
79. Gu Y., Taifour T., Bui T. et al. Osteopontin is a therapeutic target that drives breast cancer recurrence. *Nat. Commun.* 2024. Vol. 15, no. 1. Art. 9174. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53023-9>.
80. Mi Z., Guo H., Russell M. B. et al. RNA aptamer blockade of osteopontin inhibits growth and metastasis of MDA-MB231 breast cancer cells. *Mol. Ther.* 2009. Vol. 17, no. 1. P. 153–161. DOI: <https://doi.org/10.1038/mt.2008.235>.
81. Liu F., Zhang J., Gu X., Guo Q., Guo W. Single-cell transcriptome sequencing reveals SPP1-CD44-mediated macrophage-tumor cell interactions drive chemoresistance in TNBC. *J. Cell. Mol. Med.* 2024. Vol. 28, no. 13. Art. e18525. DOI: <https://doi.org/10.1111/jcmm.18525>.
82. Xu Y., Zhang Y., Lu W., Mi Y., Chen Y. Prognostic value of osteopontin expression in breast cancer: a meta-analysis. *Mol. Clin. Oncol.* 2015. Vol. 3, no. 2. P. 357–362. DOI: <https://doi.org/10.3892/mco.2014.480>.
83. Bramwell V. H., Tuck A. B., Chapman J. A. W. et al. Assessment of osteopontin in early breast cancer: correlative study in a randomised clinical trial. *Breast Cancer Res.* 2014. Vol. 16. Art. R8. DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr3600>.
84. Young M. F., Kerr J. M., Ibaraki K. et al. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1992. No. 281. P. 275–294.
85. Gilles C., Bassuk J. A., Pulyaeva H., Sage E. H., Foidart J. M., Thompson E. W. SPARC/osteonectin induces matrix metalloproteinase 2 activation in human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 1998. Vol. 58, no. 23. P. 5529–5536.
86. Alcaraz L. B., Mallavialle A., David T. et al. A 9-kDa matricellular SPARC fragment released by cathepsin D exhibits pro-tumor activity in the triple-

- negative breast cancer microenvironment. *Theranostics*. 2021. Vol. 11, no. 13. P. 6173–6192. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.58254>.
87. Dhanesuan N., Sharp J. A., Blick T., Price J. T., Thompson E. W. Doxycycline-inducible expression of SPARC/osteonectin/BM40 in MDA-MB-231 human breast cancer cells results in growth inhibition. *Breast Cancer Res. Treat.* 2002. Vol. 75, no. 1. P. 73–85. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1016536725958>.
 88. Koblinski J. E., Kaplan-Singer B. R., VanOsdol S. J. et al. Endogenous osteonectin/SPARC/BM-40 expression inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell metastasis. *Cancer Res.* 2005. Vol. 65, no. 16. P. 7370–7377. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0807>.
 89. Alcaraz L. B., Mallavialle A., Mollevi C. et al. SPARC in cancer-associated fibroblasts is an independent poor prognostic factor in non-metastatic triple-negative breast cancer and exhibits pro-tumor activity. *Int. J. Cancer*. 2023. Vol. 152, no. 6. P. 1243–1258. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.34345>.
 90. Shi S., Ma H. Y., Han X. Y., Sang Y. Z., Yang M. Y., Zhang Z. G. Prognostic significance of SPARC expression in breast cancer: a meta-analysis and bioinformatics analysis. *Biomed. Res. Int.* 2022. Vol. 2022. Art. 8600419. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/8600419>.
 91. Lindner J. L., Loibl S., Denkert C. et al. Expression of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in breast cancer and response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Oncol.* 2015. Vol. 26, no. 1. P. 95–100. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu487>.
 92. Bergamaschi A., Tagliabue E., Sørli T. et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J. Pathol.* 2008. Vol. 214, no. 3. P. 357–367. DOI: <https://doi.org/10.1002/path.2278>.
 93. Ma J., Gao S., Xie X. et al. SPARC inhibits breast cancer bone metastasis and may be a clinical therapeutic target. *Oncol. Lett.* 2017. Vol. 14, no. 5. P. 5876–5882. DOI: <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6925>.

94. Habanjar O., Bingula R., Decombat C., Diab-Assaf M., Caldefie-Chezet F., Delort L. Crosstalk of inflammatory cytokines within the breast tumor microenvironment. *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, no. 4. Art. 4002. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24044002>.
95. Xie G., Yao Q., Liu Y. et al. IL-6-induced epithelial-mesenchymal transition promotes the generation of breast cancer stem-like cells analogous to mammosphere cultures. *Int. J. Oncol.* 2012. Vol. 40, no. 4. P. 1171–1179. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1275>.
96. Kim S. Y., Kang J. W., Song X. et al. Role of the IL-6-JAK1-STAT3-Oct-4 pathway in the conversion of non-stem cancer cells into cancer stem-like cells. *Cell Signal.* 2013. Vol. 25, no. 4. P. 961–969. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.01.007>.
97. Oh K., Lee O. Y., Shon S. Y. et al. A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. *Breast Cancer Res.* 2013. Vol. 15, no. 5. Art. R79. DOI: <https://doi.org/10.1186/bcr3473>.
98. Gupta S., Jain A., Syed S. N. et al. IL-6 augments IL-4-induced polarization of primary human macrophages through synergy of STAT3, STAT6 and BATF transcription factors. *Oncoimmunology.* 2018. Vol. 7, no. 10. Art. e1494110. DOI: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1494110>.
99. Salgado R., Junius S., Benoy I. et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int. J. Cancer.* 2003. Vol. 103, no. 5. P. 642–646. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.10833>.
100. Ahmad N., Ammar A., Storr S. J. et al. IL-6 and IL-10 are associated with good prognosis in early stage invasive breast cancer patients. *Cancer Immunol. Immunother.* 2018. Vol. 67, no. 4. P. 537–549. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2106-8>.
101. Chu P. Y., Wang S. M., Chen P. M., Tang F. Y., Chiang E. P. I. Expression of MTDH and IL-10 is an independent predictor of worse prognosis in ER-

- negative or PR-negative breast cancer patients. *J. Clin. Med.* 2020. Vol. 9, no. 10. Art. 3153. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm9103153>.
102. Jiang S., Zhang H. W., Lu M. H. et al. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.* 2010. Vol. 70, no. 8. P. 3119–3127. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4250>.
 103. Wang J., Wang Q., Guan Y. et al. Breast cancer cell-derived microRNA-155 suppresses tumor progression via enhancing immune cell recruitment and antitumor function. *J. Clin. Invest.* 2022. Vol. 132, no. 19. Art. e157248. DOI: <https://doi.org/10.1172/JCI157248>.
 104. Chen C. Y. A., Chang J. T., Ho Y. F., Shyu A. B. MiR-26 down-regulates TNF- α /NF- κ B signalling and IL-6 expression by silencing HMGA1 and MALT1. *Nucleic Acids Res.* 2016. Vol. 44, no. 8. P. 3772–3787. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw205>.
 105. Chai Z. T., Zhu X. D., Ao J. Y. et al. MicroRNA-26a suppresses recruitment of macrophages by down-regulating macrophage colony-stimulating factor expression through the PI3K/Akt pathway in hepatocellular carcinoma. *J. Hematol. Oncol.* 2015. Vol. 8. Art. 56. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13045-015-0150-4>.
 106. Tian Y., Zhang M., Fan M. et al. A miRNA-mediated attenuation of hepatocarcinogenesis in both hepatocytes and Kupffer cells. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2022. Vol. 30. P. 1–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.08.036>.
 107. He W., Zhao H., Xue W. et al. Qingre Huoxue Decoction alleviates atherosclerosis by regulating macrophage polarization through exosomal miR-26a-5p. *Drug Des. Devel. Ther.* 2024. Vol. 18. P. 6389–6411. DOI: <https://doi.org/10.2147/DDDT.S487476>.
 108. Egeland N. G., Jonsdottir K., Aure M. R. et al. MiR-18a and miR-18b are expressed in the stroma of oestrogen receptor alpha negative breast cancers.

- BMC Cancer. 2020. Vol. 20, no. 1. Art. 377. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12885-020-06857-7>.
109. Xu D., Chen W. Q., Liang M. X. et al. Tumor-derived small extracellular vesicles promote breast cancer progression by upregulating PD-L1 expression in macrophages. *Cancer Cell Int.* 2023. Vol. 23. Art. 137. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02980-0>.
 110. Nair M. G., Apoorva D., Chandrakala M. et al. miR-18a mediates immune evasion in ER-positive breast cancer through Wnt signaling. *Cells.* 2022. Vol. 11, no. 10. Art. 1672. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11101672>.
 111. Brierley J. D., Gospodarowicz M. K., Wittekind C. (eds.). *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2017.
 112. Linder D. P., Poberiĭ I. A., Rozkin M. Ia., Efimov V. S. Morphometric analysis of a mast cell population. *Arkh. Patol.* 1980. Vol. 42, no. 6. P. 60–64.
 113. Grigorev I. P., Korzhevskii D. E. Modern imaging technologies of mast cells for biology and medicine (review). *Sovremennye Tekhnologii v Meditsine.* 2021. Vol. 13, no. 4. P. 93–107. DOI: <https://doi.org/10.17691/stm2021.13.4.10>.
 114. McClelland R. A., Wilson D., Leake R., Finlay P., Nicholson R. I. A multicentre study into the reliability of steroid receptor immunocytochemical assay quantification. *British Quality Control Group. Eur. J. Cancer.* 1991. Vol. 27, no. 6. P. 711–715. DOI: [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(91\)90171-9](https://doi.org/10.1016/0277-5379(91)90171-9).
 115. Fedchenko N., Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review. *Diagn. Pathol.* 2014. Vol. 9. Art. 221. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13000-014-0221-9>.
 116. Seyed Jafari S. M., Hunger R. E. IHC optical density score: a new practical method for quantitative immunohistochemistry image analysis. *Appl.*

- Immunohistochem. Mol. Morphol. 2017. Vol. 25, no. 1. P. e12–e13. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000370>.
117. Marcial-Quino J., Gómez-Manzo S., Fierro F. et al. Stem-loop RT-qPCR as an efficient tool for the detection and quantification of small RNAs in *Giardia lamblia*. Genes. 2016. Vol. 7, no. 12. Art. 131. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes7120131>.
 118. Rao X., Huang X., Zhou Z., Lin X. An improvement of the $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat. Bioinform. Biomathemat. 2013. Vol. 3, no. 3. P. 71–85.
 119. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Zadvornyi T., Lukianova N. Osteopontin-regulated changes in the mast cell population associated with breast cancer. Exp. Oncol. 2024. Vol. 46, no. 3. P. 209–220. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.03.209>.
 120. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Borikun T., Lukianova N. Mast cells as a factor in regulation of breast cancer stromal component associated with breast cancer aggressiveness. Exp. Oncol. 2024. Vol. 46, no. 4. P. 311–323. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.04.311>.
 121. Pavlova A., Mushii O., Bazas V., Karacharova I., Zadvornyi T., Lukianova N. Tumor-associated macrophages: relationship with clinical status of patients and molecular biological features of breast cancer. Exp. Oncol. 2025. Vol. 47, no. 2. P. 197–206. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.02.197>.
 122. Pavlova A., Mushii O., Zadvornyi T., Bazas V., Karacharova I., Lukianova N. Associations of tumor-associated macrophage infiltration with cytokine extracellular matrix signatures in breast cancer microenvironment. Exp. Oncol. 2026. Vol. 47, no. 4. P. 433–442. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2025.04.433>.
 123. Chekhun V., Pavlova A., Zadvornyi T. et al. Expression of SPP1 and SPARC genes in tumor tissue of patients with breast cancer. Exp. Oncol. 2024. Vol.

- 46, no. 1. P. 13–21. DOI: <https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.01.013>.
124. Чехун В. Ф., Лук'янова Н. Ю., Тодор І. М. та ін. Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу раку молочної залози: методичні рекомендації. Київ, 2023. 17 с.
 125. 7. Pavlova A., Borikun T., Lukianova Y., Zadvornyi T. Correlation between expression of OPN and ON in tumour tissue and circulating cytokines in patients with breast cancer. Abstracts of the International Scientific Conferences on Medicine & Public Health, Research Week 2023, Rīga Stradiņš University, 27–31 March 2023, Riga, Latvia. *Medicina* (Kaunas). 2023. Vol. 59, Suppl. 2. P. 153.
 126. Borikun T., Pavlova A., Zadvornyi T., Lukianova N. Evaluation of mRNA and protein profiles of IL-6 and IL-10 as blood biomarkers for breast cancer prognosis. Abstracts of the Conference “Assessment of Quality of Life in Cancer Patients Covered in Experimental and Clinical Oncology Publications: Challenges and Opportunities”, October 3–4, 2024, Kyiv, Ukraine. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 4. P. 410. DOI: [10.15407/exp-oncology.2024.04.410](https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.04.410).
 127. N. Lukianova, O. Mushii, T. Zadvornyi, A. Pavlova, T. Burda, V. Chekhun. Osteopontin-regulated changes in the mast cell population are associated with breast cancer: стендова доповідь. International Conference “Assessment of Quality of Life in Cancer Patients Covered in Experimental and Clinical Oncology Publications: Challenges and Opportunities”, October 3–4, 2024, Kyiv, Ukraine. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 4. P. 421. DOI: [10.15407/exp-oncology.2024.04.410](https://doi.org/10.15407/exp-oncology.2024.04.410).
 128. Livandovska S., Borikun T., Pavlova A., Lukianova N. Prognostic value of interleukin-6 and interleukin-10 genes expression in patients with breast cancer. XXI International Conference “Shevchenkivska Vesna”. Kyiv, Ukraine, April 24–26, 2024. P. 191-192.

129. Pavlova A., Mushii O., Zadvornyi T. Tumor-associated macrophages as a prognostic factor for the breast cancer course. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology—the Development Outlook in the 21st Century”. Kyiv, 2025. P. 86.
130. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Zadvornyi T. Relationships of macrophages infiltration with the tumor extracellular composition and cytokine profile in breast cancer. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology—the Development Outlook in the 21st Century”. Kyiv, 2025. P. 85.
131. Yeshchenko M., Voronin D., Pavlova A., Mushii O. Infiltration and functional activity of mast cells in the tissue of benign and malignant breast neoplasms. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology—the Development Outlook in the 21st Century”. Kyiv, 2025. P. 88
132. Nagasaka A., Matsue H., Matsushima H. et al. Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells. *Eur. J. Immunol.* 2008. Vol. 38, no. 2. P. 489–499. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.200737057>.
133. Ng C. W., Tam I. Y. S., Sam S. W., Yu Y., Lau H. Y. A. Immobilized osteopontin enhances adhesion but suppresses cytokine release of anti-IgE activated human mast cells. *Front. Immunol.* 2018. Vol. 9. Art. 1109. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01109>.

ДОДАТОК Б

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕЕРТАЦІЇ

1. Chekhun V., Pavlova A., Zadvornyi T., Borikun T., Naleskina L., Mushii O., Bazas V., Lukianova N. Expression of SPP1 and SPARC genes in tumor tissue of patients with breast cancer. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 1. P. 13–21. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.01.013.
2. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Zadvornyi T., Lukianova N. Osteopontin-regulated changes in the mast cell population associated with breast cancer. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 3. P. 209–220. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.03.209.
3. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Borikun T., Lukianova N. Mast cells as a factor in regulation of breast cancer stromal component associated with breast cancer aggressiveness. *Experimental Oncology*. 2024. Vol. 46, No. 4. P. 311–323. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.04.311.
4. Pavlova A., Mushii O., Bazas V., Karacharova I., Zadvornyi T., Lukianova N. Tumor-associated macrophages: relationship with clinical status of patients and molecular biological features of breast cancer. *Experimental Oncology*. 2025. Vol. 47, No. 2. P. 197–206. DOI: 10.15407/exp-oncology.2025.02.197.
5. Pavlova A., Mushii O., Zadvornyi T., Bazas V., Karacharova I., Lukianova N. Associations of tumor-associated macrophage infiltration with cytokine extracellular matrix signatures in breast cancer microenvironment. *Experimental Oncology*. 2025. Vol. 47, No. 4. P. 433–442. DOI: 10.15407/exp-oncology.2025.04.433.
6. Матрицелюлярні протеїни як маркери агресивності перебігу раку молочної залози: методичні рекомендації / В. Ф. Чехун, Н. Ю. Лук'янова, І. М. Тодор, Л. А. Налєскіна, І. В. Шепеленко, Т. В. Борікун, Т. В. Задворний, В. М. Базась, Л. М. Кунська, А. О. Павлова, О. М. Мушій. Київ, 2023. 17 с.

7. Pavlova A., Borikun T., Lukianova Y., Zadvornyi T. Correlation between expression of OPN and ON in tumour tissue and circulating cytokines in patients with breast cancer. Abstracts of the International Scientific Conferences on Medicine & Public Health, Research Week 2023, Rīga Stradiņš University, 27–31 March 2023, Riga, Latvia. Medicina (Kaunas). 2023. Vol. 59, Suppl. 2. P. 153.
8. Borikun T., Pavlova A., Zadvornyi T., Lukianova N. Evaluation of mRNA and protein profiles of IL-6 and IL-10 as blood biomarkers for breast cancer prognosis. Abstracts of the Conference “Assessment of Quality of Life in Cancer Patients Covered in Experimental and Clinical Oncology Publications: Challenges and Opportunities”, October 3–4, 2024, Kyiv, Ukraine. Experimental Oncology. 2024. Vol. 46, No. 4. P. 410. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.04.410.
9. N. Lukianova, O. Mushii, T. Zadvornyi, A. Pavlova, T. Burda, V. Chekhun. Osteopontin-regulated changes in the mast cell population are associated with breast cancer: стендова доповідь. International Conference “Assessment of Quality of Life in Cancer Patients Covered in Experimental and Clinical Oncology Publications: Challenges and Opportunities”, October 3–4, 2024, Kyiv, Ukraine. Experimental Oncology. 2024. Vol. 46, No. 4. P. 421. DOI: 10.15407/exp-oncology.2024.04.410.
10. Livandovska S., Borikun T., Pavlova A., Lukianova N. Prognostic value of interleukin-6 and interleukin-10 genes expression in patients with breast cancer. XXI International Conference “Shevchenkivska Vesna”. Kyiv, Ukraine, April 24–26, 2024. P. 191-192.
11. Pavlova A., Mushii O., Zadvornyi T. Tumor-associated macrophages as a prognostic factor for the breast cancer course: стендова доповідь. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – Development Prospects in the 21st Century”, April 29–30, 2025. Kyiv, 2025. P. 86.
12. Mushii O., Pavlova A., Bazas V., Zadvornyi T. Relationships of macrophage

infiltration with the tumor matricellular composition and cytokine profile in breast cancer: стендова доповідь. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – Development Prospects in the 21st Century”, April 29–30, 2025. Kyiv, 2025. P. 85.

13. Yeshchenko M., Voronin D., Pavlova A., Mushii O. Infiltration and functional activity of mast cells in the tissue of benign and malignant breast neoplasms: стендова доповідь. V International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – Development Prospects in the 21st Century”, April 29–30, 2025. Kyiv, 2025. P. 88

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. International Scientific Conferences on Medicine & Public Health, Research Week 2023 (27–31 березня 2023 р., Rīga Stradiņš University, м. Рига, Латвія) – тези.
2. XXI Міжнародній конференції «Shevchenkivska Vesna» (24–26 квітня 2024 р., м. Київ, Україна) – тези.
3. Міжнародній конференції «Assessment of Quality of Life in Cancer Patients Covered in Experimental and Clinical Oncology Publications: Challenges and Opportunities» (3–4 жовтня 2024 р., м. Київ, Україна) – стендова доповідь.
4. V Міжнародній науковій конференції «Microbiology and Immunology – Development Prospects in the 21st Century» (29–30 квітня 2025 р., м. Київ, Україна) – стендова доповідь.