

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ДАНИЛА ГАЛИЦЬКОГО

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Дудаш Андрій Петрович

УДК: 618.193-006.6-033.2-036-018-074/-078.73-037

ДИСЕРТАЦІЯ

ІНФІЛЬТРАТИВНИЙ ПРОТОКОВИЙ РАК ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ: КЛІНІКО-
МОРФОЛОГІЧНІ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ РІЗНИХ
МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ І ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ

222 Медицина

22 Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

А.П. Дудаш

Науковий керівник: Волос Лілія Іванівна, доктор медичних наук, професор

Львів – 2023

АНОТАЦІЯ

Дудаш А.П. Інфільтративний протоковий рак грудної залози: клініко-морфологічні та імуногістохімічні особливості різних молекулярних підтипів і прогнозування перебігу. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 – «Медицина» (22 – «Охорона здоров'я»). – Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, Львів, 2023.

Дисертація присвячена підвищенню якості діагностики інфільтративного протокового раку грудної залози шляхом визначення клініко-морфологічних, ультраструктурних та імуногістохімічних особливостей молекулярних підтипів та встановлення їх зв'язку з прогностичними чинниками перебігу захворювання.

Рак грудної залози (РГЗ) є одним з найчастіше діагностованих онкологічних захворювань та основною причиною смерті від раку серед жінок у всьому світі, визначається як група захворювань з варіабельною морфологією, молекулярними особливостями, поведінкою та відповіддю на терапію. Зі збільшенням можливостей лікування в епоху прецизійної медицини традиційні клініко-патологічні прогностичні змінні і встановлені молекулярні прогностичні маркери виявилися недостатніми для відображення такого ступеня гетерогенності. Необхідний пошук додаткових молекулярних маркерів для персоналізованого підходу до терапії, а для вдосконалення лікування раку необхідні прогностичні біомаркери. У зв'язку з цим, на чільне місце в прогнозуванні виживаності виходить молекулярна морфопатологія. Відмінності в експресії таких маркерів, як епітеліальний кадгерин (Е-кадгерин), що відіграє важливу роль у процесі клітинної адгезії, є потужним супресором інвазії та метастазування, циклооксигеназа-2 (СОХ-2) і її важлива роль у пухлинній трансформації, проліферації клітин і неоваскуляризації, розподіл інфільтруючих пухлину лімфоцитів, щільність та інтенсивність їх

експресії, зможуть пояснити, чому порівнювані за поширеністю і гістологічною структурою пухлини відрізняються за перебігом захворювання.

Таким чином, встановлення клініко-морфологічних, ультраструктурних та імуногістохімічних особливостей молекулярних підтипів інфільтративного протокового РГЗ та дослідження їх зв'язку з відомими прогностичними чинниками допоможуть визначити перебіг захворювання і стануть основою до персоналізованого лікування для запобігання розвитку рецидивів і метастазів у хворих на РГЗ. Вирішення поставленої мети було досягнуто завдяки застосуванню сучасних методів дослідження інфільтративного протокового РГЗ: гістологічних, імуногістохімічних, електронно-мікроскопічних, морфометричних і статистичної обробки цифрових даних.

Основою наукової роботи було комплексне клініко-морфологічне дослідження 193 випадків інфільтративного протокового РГЗ. Цільова вибірка для дослідження формувалася ретроспективно із загального варіаційного ряду хворих на інфільтративний протоковий РГЗ, яким не проводилася неoad'ювантна хіміо-променева чи гормонотерапія та попередні хірургічні втручання. Дані про хворих на інфільтративний протоковий РГЗ містяться в архівах Львівського онкологічного регіонального лікувально-діагностичного центру. Після проведення стандартизації за цільовими віковими, клінічними та гістологічними параметрами загальна вибірка із 193 хворих була класифікована на основі статусу експресії ER / PR / HER-2/neu та Ki-67 на чотири молекулярні підтипи відповідно консенсусних визначень молекулярних підтипів St. Gallen і сформовані наступні когорти: люмінальний А підтип; люмінальний В підтип; Her-2/neu+; потрійний негативний. ІГХ дослідження проводили на зрізах із парафінових блоків, призначених для стандартного морфологічного дослідження, відповідно до протоколу виробника з необхідними контролюями. В ході проведення ІГХ дослідження нами дана оцінка імуногістохімічного забарвлення ER, PR, Her-2/neu і Ki-67, CD3, CD20 і CD56, COX-2, E-кадгерин та CD31. Окрім світлової, нами використана скануюча електронна мікроскопія, яка є методом дослідження

поверхні зразків. Для оцінки зв'язків між клініко-патологічними ознаками, імуногістохімічними маркерами використовували непараметричний аналіз з обчисленням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена (R), для прогнозування пухлино-інфільтруючих лімфоцитів – мультифакторний регресійний аналіз.

Проведений ретроспективний аналіз розподілу пацієнток загальної вибірки на взаємовиключні молекулярні підтипи за допомогою імуногістохімії щодо ER, PR, Ki-67 та білка HER-2/ neu показав найбільший відсоток зразків з рецепторним профілем люмінального А раку грудної залози (40,93%), що було майже у 2 рази більше від люмінального В підтипу (22,28%) та HER-2/neu+ (20,21%), і в 2,5 рази більше від потрійного негативного підтипу (16,58%). Порівняльний морфологічний аналіз інвазивного компонента протокового РГЗ дозволив встановити внутрішньопухлинну гетерогенність і виявити структурні особливості молекулярних підтипів пухлин. Змішана морфологічна картина найчастіше діагностувалася у пухлинах люмінального А підтипу і переважала в 3,2 рази, ніж у пухлинах потрійного негативного підтипу, у 2,03 рази частіше діагностувалася, ніж в Her-2/neu+ раку грудної залози і в 1,41 рази – ніж у люмінальному В підтипу ($p < 0,05$). Достовірне переважання морфологічних структур одного типу виявлялося в потрійному негативному РГЗ в 1,9 рази порівняно з Her-2/neu+, у 5 разів – порівняно з люмінальним А підтипом, в 4,4 рази – порівняно з люмінальним В підтипом ($p < 0,05$). Скануюча електронна мікроскопія дозволила виділити три варіанти поверхневої конфігурації пухлинних клітин протокового раку грудної залози залежно від ступеня диференціювання і гістологічної будови інвазивного компонента.

Дослідження адгезії між пухлинними клітинами показало, що низька експресія E-кадгерину чи її відсутність, яка спостерігалася у 53,49% випадків раку грудної залози, пов'язана з пухлинами розміром ≥ 5 см, ураженням лімфатичних вузлів N1-2, з G2 і G3 ступенями злоякісності і переважала в потрійному негативному підтипі (70%; $p = 0,011$). Високий рівень експресії E-кадгерину переважав у люмінальному А підтипі (64%; $p = 0,023$) та достовірно

прямо корелював з відсутністю метастатичного ураження лімфатичних вузлів N0 ($r= +0,48$; $p=0,00002$) і з високим ступенем диференціації G1 ($r= +0,23$; $p=0,03$), а також зворотно – з N2 ($r= -0,55$; $p=0,0001$) і з низьким ступенем диференціації пухлини G3 ($r= -0,26$; $p=0,016$).

Оцінюючи активність ферменту COX-2, нами встановлено надмірну експресію в пухлинах потрійного негативного (75%) та Her-2/neu+ підтипів (73,68%) в порівнянні з люмінальним А (20%) та люмінальним В (50%) підтипами. В карциномах потрійного негативного підтипу встановлено достовірний прямий помірний зв'язок між надекспресією COX-2 та N2 ($r= +0,38$; $p < 0,05$) і зворотний високий кореляційний зв'язок з N0 ($r= -0,71$; $p=0,0004$); у пухлинах з Her-2/neu+ підтипом достовірний прямий високий зв'язок з N ($r= +0,77$; $p=0,0001$), помірний прямий зв'язок з N2 ($r= +0,57$; $p=0,01$). У сукупності надмірна експресія COX-2 асоціювалася з потрійним негативним та Her-2/neu+ фенотипами з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів.

Дослідження ангиогенезу показало, що найбільш значущими з прогностичної точки зору були атипові дилатовані судини та структури з частковою ендотеліальною вистилкою. Множинні атипові дилатовані капіляри діагностувалися в інтратуморальній стромі і переважали в потрійному негативному (40%) і HER-2/neu+ (26,32%) підтипах. Множинні структури з частковою ендотеліальною вистилкою корелювали з G2 ($r= +0,22$; $p=0,046$) та G3 ($r= +0,30$; $p=0,005$), з N2 ($r= +0,44$; $p < 0,00001$), значна їх кількість спостерігалася в потрійному негативному підтипі ($p < 0,05$).

Наявність пухлино-інфільтруючих лімфоцитів визнано важливим імунологічним біомаркером, який відображає протипухлинну імунну відповідь при раку грудної залози. У всіх варіантах порівняння показників за видами лімфоцитів (внутрішньопухлинних і на інвазивному краї) встановлено достовірну різницю $p < 0,001$. Щільність розподілу CD3- і CD20-лімфоцитів була більшою внутрішньопухлинно і біля інвазивного краю в нелюмінальних підтипах в порівнянні з люмінальними А і В підтипами. Найменша щільність

розподілу CD56-клітин серед пухлино-інфільтруючих лімфоцитів виявлялася внутрішньопухлинно при люмінальних підтипах. Відсоток інфільтратів CD3 і CD20 як всередині пухлинного вогнища, так і на інвазивному краї, а також CD56 на інвазивному краї був значно нижче при G1 і G2, ніж при G3 ($p < 0,01$).

Встановлено кореляційні парні та множинні (поєднані) взаємозв'язки між клініко-морфологічними та імуногістохімічними параметрами, які сприяють визначенню перебігу захворювання. В карциномах G3 потрійного негативного підтипу спостерігається низька експресія E-кадгеринів, надекспресія COX-2 і зростає частка CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів. У люмінальному A підтипі встановлено поєднаний взаємозв'язок між високою експресією E-кадгерину, низькою щільністю розподілу CD3 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини і морфологічною будовою інвазивного компонента переважно з різних типів структур. Моделювання прогностичних рівнів скупчень пухлино-інфільтруючих лімфоцитів при різних молекулярних підтипах інфільтративного протокового раку грудної залози дало змогу спрогнозувати значення показників CD3, CD20, CD56 для пацієнтів кожної групи залежно від поданих чинників. У 77,6% випадків потрійного негативного підтипу наявність пухлини розміром T2 ($p=0,013$) із ступенем диференціації пухлини G ($p=0,0003$) і високим рівнем експресії COX-2 буде мати прямий вплив на значення показника CD3 на інвазивному краї. У хворих з люмінальним A підтипом у 95,4% випадків доведений сильний вплив чотирьох незалежних предикторів на значення показника CD20 на інвазивному краї: стадія пухлини T1 ($p=0,0000$), метастатичне ураження лімфатичних вузлів (N, $p<0,0001$), переважання різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті ($p=0,0000$) і наявність структур з частковою ендотеліальною вистилкою ($p=0,037$).

Наукова новизна отриманих результатів. Вперше показано, що інфільтративна протокова карцинома грудної залози демонструє гетерогенність морфологічної будови та ультраструктури інвазивного компоненту залежно від молекулярно підтипу. Показано, що люмінальні раки

грудної залози різноманітні за морфологічною будовою інвазивного компонента, а достовірне переважання морфологічних структур одного типу визначено в потрійному негативному раку грудної залози в 1,9 раза порівняно з Her-2/neu+, у 5 разів – порівняно з люмінальним А підтипом, в 4,4 раза – порівняно з люмінальним В підтипом ($p < 0,05$). Отримано додаткові дані про ультраструктуру клітинної поверхні інфільтративного протокового раку грудної залози. Встановлено, що зменшення або відсутність асиметричних мікрворсинок на клітинній поверхні діагностувалося при ступенях злоякості G2 і G3. Визначено рівні експресії E-кадгерину, COX-2, CD31, лімфоїдної запальної інфільтрації в молекулярних підтипах інфільтративного протокового раку грудної залози і їх зв'язок з відомими прогностичними чинниками. Уточнено наукові дані про морфологію мікросудин в інвазивному компоненті потрійного негативного і Her2/neu+ молекулярних підтипів – наявність множинних атипичних дилатованих капілярів і структур з частковою ендотеліальною вистилкою в інтратуморальній стромі. Вперше встановлено особливості лімфоїдного мікрооточення та оцінено розподіл інфільтруючих пухлину Т-і В-лімфоцитів та НК-клітин в різних молекулярних підтипах, свідченням чого є достовірне переважання щільності Т- і В-лімфоцитів внутрішньопухлинно і біля інвазивного краю в нелюмінальних підтипах в порівнянні з люмінальними А і В; щільність внутрішньопухлинних Т-лімфоцитів була найвищою в потрійному негативному раку і значно достовірно переважала за щільність в люмінальному підтипі А ($p < 0,01$). Досліджено кореляційні та поєднані взаємозв'язки між експресією маркерів, що характеризують інвазивні властивості пухлини, і відомими прогностичними чинниками перебігу захворювання. Вперше на моделі прогнозування рівнів пухлино-інфільтруючих лімфоцитів встановлений вплив незалежних клініко-патогістологічних факторних ознак на рівень лімфоцитів (внутрішньопухлинних та на інвазивному краї) в люмінальних і нелюмінальних карциномах грудної залози.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено та впроваджено в практику спосіб оцінки стану мікросудин в інфільтративному протоковому раку грудної залози. Його значення полягає в тому, що наявність в потрібному негативному і Her2/neu+ підтипах множинних атипових дилатованих капілярів і структур з частковою ендотеліальною вистилкою в інтратуморальній стромі є значущим несприятливим морфологічним прогностичним чинником (Інф. лист №2-2023). Доведено важливість встановлення морфологічних особливостей інвазивного компонента і внутрішньопухлинної гетерогенності в протоковому раку грудної залози. Запропоновано виділення пухлин з надмірною експресією COX-2 в окрему групу, так як вона асоціювалася з потрібним негативним та Her-2/neu+ фенотипами з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів.

Результати дослідження дозволяють проаналізувати можливість прогнозування перебігу захворювання на основі визначення рівня експресії E-кадгеринів в пухлинній тканині та порівняння за експресією в люмінальних та нелюмінальних підтипах. Запропонована регресійна мультифакторна модель дозволяє спрогнозувати значення показників CD3, CD20, CD56 в інфільтративному протоковому раку грудної залози залежно від поданих факторних ознак, що має медичне та економічне значення, дасть змогу приймати оперативне рішення стосовно лікування без очікування результатів дороговартісних досліджень.

Ключові слова: інфільтративний протоковий рак грудної залози (молочної залози), молекулярні підтипи (люмінальний А, люмінальний В, тричі негативний, Her-2/neu позитивний), гістопатологія, ультраструктура, імуногістохімія, естроген, прогестерон, Her-2/neu, індекс проліферативної активності Ki-67, E-кадгерин, COX-2, ангиогенез CD31, пухлинне мікрооточення (CD3, CD20, CD56), прогноз перебігу.

ANNOTATION

Dudash A.P. Infiltrative ductal breast cancer: clinical, morphological and immunohistochemical features of different molecular subtypes and prognosis. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Thesis for obtaining PhD degree by the specialty 222 – «Medicine», 22 – «Health care». – Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Lviv, 2023.

The thesis presents the quality of diagnostics of infiltrative ductal breast cancer by determining the clinical-morphological, ultrastructural and immunohistochemical features of molecular subtypes and establishing their relationship with prognostic factors of the course of the disease.

Breast cancer (BC) is one of the most frequently diagnosed oncological diseases and the leading cause of cancer death among women worldwide. It is defined as a group of diseases with variable morphology, molecular features, behavior, and response to therapy. Additional molecular markers are needed for a personalized approach to therapy, and prognostic biomarkers are necessary to improve cancer treatment. Therefore, molecular morphopathology takes a prominent place in tumor prognosis. Differences in the expression of markers such as epithelial cadherin (E-cadherin), which plays an important role in the process of cell adhesion, is a powerful suppressor of invasion and metastasis, cyclooxygenase-2 (COX-2) and its important role in tumor transformation, cell proliferation and neovascularization, distribution of infiltrating tumor lymphocytes, density and intensity of their expression, may explain why tumors that are comparable in prevalence and histological structure differ in the course of the disease.

Thus, establishing of clinical-morphological, ultrastructural and immunohistochemical features of molecular subtypes of invasive ductal carcinoma and the study of their connection with known prognostic factors will help to determine the course of the disease and will become the basis for personalized treatment to prevent the development of recurrence and metastases in patients with invasive ductal carcinoma.

The goal was achieved by using a complex of modern research methods of invasive ductal breast carcinoma: histological, immunohistochemical, electron microscopic, morphometric, and statistical processing of digital data. The basis of the scientific work was a comprehensive clinical and morphological study of 193 cases of invasive ductal carcinoma of the breast. The target sample for the study was formed retrospectively from the general variation range of patients with invasive ductal carcinoma of the breast who did not receive neoadjuvant chemotherapy, radiation or hormone therapy, and previous surgical interventions. Data on patients with invasive ductal carcinoma of the breast are contained in the archives of the Lviv Regional Oncological Diagnostic and Treatment Center. After standardization based on target age, clinical, and histological parameters, the total sample of 193 patients was classified into four molecular subtypes according to the consensus definitions of St. Gallen for the expression status of ER/PR/HER-2/neu and Ki-67: luminal A subtype, luminal B subtype, HER-2/neu+, and triple-negative. Immunohistochemistry (IHC) studies were conducted on sections of paraffin blocks designated for standard morphological analysis, according to the manufacturer's protocol with necessary controls. During the IHC investigation, we assessed the immunohistochemical staining of ER, PR, HER-2/neu, Ki-67, CD3, CD20, CD56, COX-2, E-cadherin, and CD31. In addition to light microscopy, we used scanning electron microscopy, which is a method for studying the surface of tumour cells. Non-parametric analysis with calculation of the Spearman rank correlation coefficient (R) was used to evaluate the relationships between clinical-pathological features and immunohistochemical markers. Multiple regression analysis was used to determine the dependence of the indicators on the active factors.

A retrospective analysis of the distribution of patients in the total sample into mutually exclusive molecular subtypes using immunohistochemistry for ER, PR, Ki-67, and HER-2/neu protein showed the highest percentage of samples with a luminal A receptor profile for breast cancer (40.93%), which was almost twice as high as the luminal B subtype (22.28%) and HER-2/neu+ (20.21%), and 2.5 times higher than the triple-negative subtype (16.58%).

Comparative morphological analysis of the invasive component of ductal breast cancer helped to determine intratumoral heterogeneity and reveal structural features in molecular subtypes. A mixed morphological patterns were most frequently diagnosed in luminal A subtype tumors, exceeding those in triple-negative subtype tumors by 3.2 times, in HER2/neu+ breast cancer by 2.03 times, and in luminal B subtype by 1.41 times ($p < 0.05$). Significant predominance of one type of the morphological structures was observed in triple-negative breast cancer by 1.9 times compared to HER2/neu+, by 5 times compared to luminal A subtype, and by 4.4 times compared to luminal B subtype ($p < 0.05$). Scanning electron microscopy identified three variants of surface configuration of tumor cells in ductal breast cancer depending on the degree of differentiation and histological structure of the invasive component.

Adhesion between tumor cells showed that low or absence of E-cadherin expression, which was observed in 53.49% of breast cancer cases, was associated with tumors ≥ 5 cm in size, N1-2 lymph node involvement, with G2 and G3 malignancy grades, and predominated in triple-negative subtype (70%; $p = 0.011$). A high level of E-cadherin expression prevailed in the luminal A subtype (64%; $p = 0.023$) and was significantly directly correlated with the absence of N0 lymph node metastasis ($r = +0.48$; $p = 0.00002$) and with a high degree of differentiation G1 ($r = +0.23$; $p = 0.03$), and with a moderate negative correlation found with N2 ($r = -0.55$; $p = 0.0001$) and with a low degree of tumor differentiation G3 ($r = -0.26$; $p = 0.016$).

Assessing COX-2 enzyme activity, we found excessive expression in triple-negative (75%) and Her-2/neu+ (73.68%) tumor subtypes compared to Luminal A (20%) and Luminal B (50%) subtypes. In triple-negative carcinomas, a significant direct moderate correlation was found between COX-2 overexpression and N2 ($r = +0.38$; $p < 0.05$) and a high inverse correlation with N0 ($r = -0.71$; $p = 0.0004$). In Her-2/neu+ tumors, a significant direct high correlation was found with N ($r = +0.77$; $p = 0.0001$) and a moderate direct correlation with N2 ($r = +0.57$; $p = 0.01$). Overall,

COX-2 overexpression was associated with triple negative and Her-2/neu+ phenotypes with metastatic lymph node involvement.

The study of angiogenesis showed that the most significant structures from a prognostic standpoint were atypical dilated vessels and structures with partial endothelial lining. Multiple atypical dilated capillaries were diagnosed in the intratumoral stroma and predominated in the triple-negative (40%) and HER-2/neu+ (26.32%) subtypes. Multiple structures with partial endothelial lining correlated with G2 ($r=+0.22$; $p=0.046$) and G3 ($r=+0.30$; $p=0.005$), with N2 ($r=+0.44$; $p<0.00001$), and their significant number was observed in the triple-negative subtype ($p<0.05$).

The presence of tumor-infiltrating lymphocytes was recognized as an important immunological biomarker reflecting the anti-tumor immune response in breast cancer. In all comparisons of lymphocyte types (intratumoral and invasive margin), a significant difference of $p<0.001$ was established. The density of CD3 and CD20 lymphocytes was higher intratumorally and near the invasive margin in non-luminal subtypes compared to Luminal A and Luminal B subtypes. The lowest density of CD56 cells among tumor-infiltrating lymphocytes was found intratumorally in Luminal subtypes. Correlations and combined relationships have been established between prognostic variables that contribute to determining the course of the disease. In G3 triple-negative carcinomas, there is low expression of E-cadherins, overexpression of COX-2, and an increase in the proportion of CD3 intratumoral lymphocytes. In the luminal A subtype, a combined relationship has been established between high expression of E-cadherins, low density of CD3 lymphocytes at the invasive tumor margin, and the invasive component predominantly composed of different types of structures. Modeling prognostic levels of tumor-infiltrating lymphocytes in different molecular subtypes of infiltrating ductal breast cancer made it possible to predict the values of CD3, CD20, CD56 indicators for patients in each group depending on the given factors.

In 77.6% of cases of the triple negative subtype, the presence of a T2 tumor size ($p=0.013$), the degree of tumor differentiation G ($p=0.0003$) and a high level of COX-2 expression will have a direct effect on the value of the CD3 indicator at the

invasive margin. In patients with luminal A subtype, in 95.4% of cases, a strong influence of four independent predictors on the value of the CD20 indicator at the invasive edge was proven: tumor stage T1 ($p=0.0000$), metastatic damage to lymph nodes (N, $p<0.0001$), the predominance of different types of morphological structures in the invasive component ($p=0.0000$) and the presence of structures with a partial endothelial lining ($p=0.037$).

Scientific novelty of the obtained results. For the first time, it has been shown that infiltrative ductal carcinoma of the breast demonstrates heterogeneity in the morphological structure and ultrastructure of the invasive component depending on the molecular subtype. It has been shown that luminal breast cancers are diverse in terms of the morphological structure of the invasive component, and a significant predominance of one type of the morphological structures has been determined in triple-negative breast cancer by 1.9 times compared to Her-2/neu+ subtype, by 5 times compared to luminal A subtype, and by 4.4 times compared to luminal B subtype ($p<0.05$). Scientific data on the ultrastructure of the cell surface of infiltrative ductal breast cancer have been supplemented. It has been established that a decrease or absence of asymmetric microvilli on the cell surface was diagnosed at degrees of malignancy G2 and G3. Expression levels of E-cadherin, COX-2, CD31, lymphoid inflammatory infiltration in molecular subtypes of infiltrative ductal breast cancer and their relationship with known prognostic factors were determined. Scientific data on the morphological features of microvessels in the invasive component have been refined, confirming the presence of multiple atypical dilated capillaries and structures with partial endothelial lining in the intratumoral stroma in triple-negative and Her2/neu+ molecular subtypes.

For the first time, the features of the lymphoid microenvironment were established and the distribution of tumor-infiltrating T- and B-lymphocytes and NK-cells in different molecular subtypes was evaluated, as evidenced by the significant predominance of the density of T- and B-lymphocytes intratumorally and near the invasive edge in non-luminal subtypes compared to luminal A and B; the density of intratumoral T-lymphocytes was the highest in triple-negative cancer and was

significantly greater than the density in luminal subtype A ($p < 0.01$). Correlative and combined relationships between the expression of markers characterizing the invasive properties of the tumor and known prognostic factors of the course of the disease were studied. For the first time, the influence of independent clinical and pathologistological factors on the level of lymphocytes (intratumoral and at the invasive edge) in luminal and non-luminal carcinomas of the breast was established on the model for predicting the levels of tumor-infiltrating lymphocytes.

Practical significance of the obtained results. A method for evaluating tumor vessels in infiltrating ductal breast carcinoma has been developed and implemented in practice. This involves the presence of multiple atypical, dilated capillaries and structures with partial endothelial lining in the intratumoral stroma being a significant adverse morphological prognostic factor in triple-negative and Her2/neu+ subtypes (Information Letter, N2-2023). The importance of establishing morphological features of the invasive component and intratumoral heterogeneity in ductal breast carcinoma has been proven. It is proposed to identify tumors with overexpression COX-2 as a separate group based on expression analysis, as overexpression COX-2 was associated with an aggressive subtype with metastatic potential and was dependent on hormonal status. The obtained results allow for the possibility of predicting the course of the disease based on determining the level of E-cadherin expression in tumor tissue and comparing it to the expression of luminal and non-luminal subtypes. A proposed regression multifactorial model allows predicting the values of CD3, CD20, and CD56 markers in infiltrating ductal breast carcinoma based on the provided factor features.

Key words: infiltrative ductal breast cancer/ mammary gland, molecular subtypes (luminal A, luminal B, triple negative, Her-2/neu positive), histopathology, ultrastructure, immunohistochemistry, estrogen, progesterone, Her-2/neu, index Ki-67, E-cadherin, COX-2, CD31 angiogenesis, tumor microenvironment (CD3, CD20, CD56), prognosis.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Volos LI, Dudash AP. Clinical and morphological features of luminal “A” subtype of invasive ductal breast cancer. *Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland)*. 2020; 43(6): 293-306. DOI: <https://doi.org/10.23856/4338> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати клініко-морфологічних особливостей люмінального А підтипу інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
2. Volos LI, Dudash AP. Invasive ductal breast carcinoma: morphological features of molecular subtypes. The modern stage of the development of medical education in Ukraine and EU countries: Collective monograph Medical University of Lublin; Riga, Latvia: “Baltija Publishing”, 2021. P.50-66. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-090-2-3> (Особистий внесок – провів аналіз патоморфологічних особливостей різних молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
3. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози. *Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu)*. 2021; Том 6, № 6 (34): 44-56. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.06.044> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати дослідження лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
4. Волос Л.І., Дацюк Ю.Р., Дудаш А.П. Скануюча електронна мікроскопія інвазивного протокового раку грудної залози/ Scanning electron microscopy of invasive ductal breast cancer. *Lviv Medical Journal /Acta Medica Leopoliensia*. 2021; Vol. 27 No. 3–4: 9-25. DOI:

- <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.009> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати електронно-мікроскопічного та гістологічного дослідження інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
5. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості експресії COX-2 в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu). 2022; Том 7, № 1 (35): 68-78. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.01.068> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати імуногістохімічного дослідження експресії циклооксигенази-2 в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
 6. Volos LI, Dudash AP. Tumor-infiltrating lymphocytes in nonluminal invasive ductal breast carcinoma. Azerbaijan Medical Journal (Scopus: Q4). 2022; 1: 131–137. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.021> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати імуногістохімічного та гістологічного дослідження пухлино-інфільтруючих лімфоцитів в нелюмінальних фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
 7. Volos LI, Dudash AP. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer. Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland). 2022; 50(1): 269-280. DOI: <https://doi.org/10.23856/5032> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати гістологічного та імуногістохімічного дослідження пухлинного ангиогенезу в інвазивному протоковому раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
 8. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості експресії молекул клітинної адгезії Е-кадгерину в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. Український журнал медицини, біології та спорту

- (Ukr. ž. med. biol. Sportu). 2022; Том 7, № 3 (37): 52-64. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.03.052> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати дослідження експресії E-кадгерину в інвазивному протоковому раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
9. Volos LI, Dudash AP. Features of E-cadherin expression in the triple negative and luminal “A” phenotypes invasive ductal breast cancer. *Azerbaijan Medical Journal* (Scopus: Q4). 2022; 3: 125–132. <https://doi.org/10.34921/amj.2022.3.020> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати імуногістохімічного дослідження E-кадгерину в потрійному негативному та люмінальному А фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
- Наукові праці, які засвідчують апробацію результатів дисертації:*
10. Dudash A., Saliuk A., Shevchenko S., Khanevska Ya. Prognostic significance of receptor tumor status in invasive ductal carcinoma. 14th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists (May 10-13th, 2018, Warsaw, Poland), Abstract Book, p.165-166. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
11. Дудаш А.П. Патоморфологічна характеристика інвазивного протокового раку грудної залози у жінок з урахуванням імунофенотипу пухлини. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання морфогенезу та ре моделювання тканин і органів у нормі та патології» та секції «Фундаментальні аспекти медицини» XVII Конгресу Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (м. Тернопіль, 20-21 вересня 2018 року).- с.258.
12. Дудаш А.П. Патоморфологічні критерії діагностики інвазивної протокової і внутрішньо-протокової карциноми in situ грудної залози.

- Перспективи розвитку сучасної патології: Матеріали X Конгресу Асоціації патологів України (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 року) / ІФНМУ, Асоц. патологів України. - Івано-Франківськ, 2018. - с.81.
13. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості морфологічної структури різних імуногістохімічних типів протокового раку грудної залози. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 року). - С.30-32. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень морфологічних особливостей інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
14. Волос Л.І., Дудаш А.П. Клініко-морфологічна та імуногістохімічна характеристика тричі-негативного інфільтративного протокового раку грудної залози. Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.: Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 25–26 травня 2019 року). – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2019. – с.9-12. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень імуногістохімічних та гістологічних особливостей потрійного негативного фенотипу інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
15. Волос Л.І., Дудаш А.П. Клініко-морфологічні особливості люмінального А типу інфільтруючого протокового раку грудної залози. Здобутки клінічної та експериментальної медицини, присвячена 165-річчю від Дня народження Івана Яковича Горбачевського: Матеріали підсумкової LXII наук.-практ. конф. (Тернопіль, 13 черв. 2019 р.) / Терноп. нац. мед. ун-т імені І. Я. Горбачевського. – Тернопіль: ТНМУ, 2019. С 41-42. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень гістологічних особливостей люмінального А

- фенотипу інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
16. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості морфологічної будови первинної пухлини інфільтративного протокового раку грудної залози люмінального В типу. Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини» (м. Львів, 21–22 червня 2019 року). – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2019. – с.9-12. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень гістологічних особливостей будови люмінального В фенотипу інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
17. Volos LI, Dudash AP. Molecular type as a prognosis factor of ductal breast cancer metastasis. Innovative development of science and education. Abstracts of the 3rd International scientific and practical conference. ISGT Publishing House. Athens, Greece. 2020. Pp. 59-65. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
18. Волос ЛІ, Дудаш АП. Ki-67 як прогностичний маркер відповідно до молекулярного підтипу раку грудної залози. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки та практики»; м. Одеса, 15-16 травня 2020 р.- Одеса: ГО «Південна фундація медицини», 2020. с.41-47. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо прогностичного значення маркера проліферативної активності Ki-67 в інвазивному протоковому раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
19. Волос ЛІ, Дудаш АП. Молекулярна гетерогенність потрійно-негативного раку грудної залози як прогностичний чинник перебігу.

- Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.»; Львів, 22–23 травня 2020 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2020, с.17-21. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо потрійного негативного раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
20. Волос Л.І., Дудаш А.П. Прогноз перебігу молекулярних типів раку грудної залози. Матеріали XVIII Конгресу Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (СФУЛТ); 1-3 жовтня 2020; Львів 2020, с. 169. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо прогнозу різних фенотипів раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
21. Volos L, Dudash A. The role of overexpression of Cyclooxygenase-2 in the prognosis of invasive ductal breast cancer. International scientific conference "Medicine and health care in modern society: actual problems and modern aspects" February 26-27, 2021. Lublin, Poland: Izdevnieciba "Baltija Publishing", 2021; 49-52. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо ролі циклооксигенази-2 для прогнозу інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
22. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. Lymphoid environment in Luminal A subtype invasive ductal breast carcinoma. (17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide, 17–21 March 2021). The Breast (Scopus, Web of Science, Q1). 2021; Vol. 56 (1S): S27. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(21\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(21)00112-0) (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози люмінального А підтипу, підготовці тез до друку).
23. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. E-cadherin expression in triple-negative invasive ductal breast carcinoma. (17th St. Gallen International

- Breast Cancer Conference Online worldwide, 17–21 March 2021). *The Breast* (Scopus, Web of Science, Q1). 2021; Vol. 56 (1S): S27-28. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(21\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(21)00113-2) (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження експресії E-кадгерину в потрійному негативному раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
24. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. Lymphoid Environment in Triple-Negative Invasive Ductal Breast Carcinoma. International scientific and practical conference "Scientific progress of medicine and pharmacy of the EU countries", April 23-24, 2021. Częstochowa, Poland: "Baltija Publishing", 2021; 26-30. (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження лімфоїдного мікрооточення в потрійному негативному раку грудної залози, підготовці тез до друку).
25. Volos L., Dudash A. Cox-2 overexpression in triple-negative invasive ductal breast cancer with correlation to clinicopathological parameters and neoangiogenesis (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). *The Breast* (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S35-36. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledition.com> (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження надмірної експресії циклооксигенази-2 в потрійному негативному раку грудної залози, підготовці тез до друку).
26. Volos L., Dudash A. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer and relationship with clinicopathological factors (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). *The Breast* (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S36-37. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledition.com> (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження морфологічних особливостей ангіогенезу і взаємозв'язку з клініко-патологічними чинниками, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).

27. Волос Л.І., Дудаш А.П. Прогнозування значення показників CD3 лімфоцитів на інвазивному краї в потрійному негативному фенотипі інфільтративного протокового раку грудної залози. Proceedings of the 7th International scientific and practical conference, March 29–31, 2023. BoScience Publisher. Boston, USA, 2023; 87-92. URL: <https://sciconf.com.ua/vii-mizhnarodna-naukovo-praktichna-konferentsiya-progressive-researchin-the-modern-world-29-31-03-2023-boston-ssha-arhiv/> (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження Т-лімфоцитів на інвазивному краї в потрійному негативному раку грудної залози і значення для прогнозу захворювання, підготовці тез до друку). *Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:*

28. Волос Л.І., Дудаш А.П. Молекулярний тип раку грудної залози як прогностичний фактор метастазування. Науковий журнал «Медичний форум», 2019; 17(17): 18-20. (Особистий внесок – провів аналіз різних молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).

29. Волос Л.І., Дудаш А.П. Надмірна експресія циклооксигенази-2 (COX-2) в потрійно-негативному і HER2/neu-позитивному фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози. Південноукраїнський медичний науковий журнал. 2022; 31: 4-10. (Особистий внесок – провів аналіз експресії циклооксигенази-2 різних в потрійно-негативному і HER2/neu-позитивному фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).

30. Діагностичне і прогностичне значення пухлинного ангиогенезу в інфільтративному протоковому раку грудної залози: інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №2-2023 / Л. І. Волос, А. П. Дудаш; ЛНМУ.– 4 с.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ, СКОРОЧЕНЬ.....	25
ВСТУП.....	26
РОЗДІЛ 1 СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МОРФОЛОГІЧНІ ТА КЛІНІКО-БІОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ ІНФІЛЬТРАТИВНОГО ПРОТОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ ПРОГНОЗУ (огляд літератури).....	37
1.1 Рак грудної залози – актуальна медична проблема сьогодення....	37
1.2 Молекулярні підтипи інфільтративного протокового раку грудної залози.....	38
1.3 Клініко-морфологічні прогностичні чинники перебігу інфільтративного протокового раку грудної залози.....	42
1.4 Імуногістохімічна характеристика інфільтративного протокового раку грудної залози для оцінки прогностичних чинників.....	46
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	64
2.1 Матеріали дослідження.....	64
2.2 Методи дослідження.....	67
2.2.1 Морфологічні методи дослідження.....	67
2.2.2 Імуногістохімічні методи дослідження.....	70
2.2.3. Скануюча електронна мікроскопія.....	76
2.2.4 Статистичні методи дослідження.....	77
РОЗДІЛ 3 МОЛЕКУЛЯРНІ ПІДТИПИ ІНФІЛЬТРАТИВНОГО ПРОТОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ КЛІНІКО- МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ	79
3.1 Молекулярні підтипи та їх характеристика	79
3.2 Морфологічні особливості інвазивного компонента молекулярних підтипів протокового раку грудної залози	89

3.3 Скануюча електронна мікроскопія інфільтративного протокового раку грудної залози	105
РОЗДІЛ 4 ЕКСПРЕСІЯ МАРКЕРІВ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ ІНВАЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТОКОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ, ЇХ ЗВ'ЯЗОК ІЗ МОРФОЛОГІЧНИМИ ПАРАМЕТРАМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНИМ ФЕНОТИПОМ ПУХЛИНИ.....	116
4.1 Особливості експресії молекул клітинної адгезії E-кадгерину в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози	118
4.2 Експресія COX-2 в асоціації з клініко-патологічними параметрами та фенотипами інвазивного протокового раку грудної залози	131
4.3 Експресія CD31 і морфологічні особливості пухлинного ангиогенезу в інвазивному протоковому раку грудної залози.....	142
4.4 Особливості лімфоїдного мікрооточення (CD3, CD20, CD56) в інвазивному протоковому раку грудної залози	153
РОЗДІЛ 5 ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРИ ІНФІЛЬТРАТИВНОМУ ПРОТОКОВОМУ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ	173
РОЗДІЛ 6 МОДЕЛЮВАННЯ ПРОГНОСТИЧНИХ РІВНІВ ПУХЛИНО-ІНФІЛЬТРУЮЧИХ ЛІМФОЦИТІВ В РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПАХ ІНФІЛЬТРАТИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ.....	201
ВИСНОВКИ.....	230
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	234
ДОДАТКИ.....	270

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ ВИМІРЮВАННЯ, СКОРОЧЕНЬ

- ВООЗ – Всесвітня Організація Охорони Здоров'я
- ГТ – гормональна терапія
- ЕМТ – епітеліально-мезенхімальна трансформація
- ІГХ – імуногістохімія
- КТ – комп'ютерна томографія
- ЛНМУ – Львівський національний медичний університет
- ЛОРЛДЦ – Львівський онкологічний регіональний лікувально-діагностичний центр
- МАТ – моноклональні антитіла
- МГЦР – мікрогемоциркуляторне русло
- МКХ – міжнародна класифікація хвороб
- МРТ – магнітно-резонансна томографія
- НДР – науково-дослідна робота
- ПТ – променева терапія
- РГЗ – рак грудної залози
- СЕМ – скануюча електронна мікроскопія
- ХТ – хіміотерапія
- СОХ-2 – циклооксигеназа-2
- ER – рецептор естрогенів
- Her-2/neu – human epidermal growth factor receptor-2 (рецептор епідермального фактору росту, тип 2)
- ММР – матриксна металопротеїназа
- PR –рецептор прогестерону
- VEGFR2 – рецептор судинного ендотеліального фактору росту 2

ВСТУП

Актуальність теми

Рак грудної залози (РГЗ) є одним з найчастіше діагностованих онкологічних захворювань та основною причиною смерті від раку серед жінок у всьому світі. У 2020 році у світі РГЗ був діагностований у 2,3 мільйона жінок, при тому було зареєстровано 685 000 випадків смерті від цієї хвороби, незважаючи на вдосконалення підходів до діагностики та лікування [1].

В Україні захворюваність на РГЗ займає перше місце серед всіх злоякісних пухлин, що виявляються у жінок. Так, у 2018 році в Україні було зафіксовано 146 317 пацієнтів, які перебувають на обліку в онколога з приводу РГЗ, показник на 100 тис. жіночого населення становив 762,1. Згідно Бюлетеню Національного канцер-реєстру №24 «Рак в Україні. 2021-2022» питома вага РГЗ у жінок серед основних 10 нозологічних форм у структурі захворюваності населення України на злоякісні пухлини є найбільшою і складає 22,2%; у структурі смертності РГЗ не поступається жодній злоякісній патології і складає 20,2% [2].

За даними Всесвітньої Організації Охорони Здоров'я (ВООЗ) головною метою боротьби з РГЗ є зниження глобальної смертності від цієї злоякісної патології на 2,5% на рік, запобігаючи тим самим 2,5 мільйонам смертей у всьому світі в період між 2020 і 2040 роками. Зменшення глобальної смертності від РГЗ на 2,5% на рік дозволить уникнути до 2030 року 25% смертей і до 2040 року 40% смертей серед жінок віком до 70 років. Для досягнення цих цілей, на думку експертів, необхідне сприяння здоров'ю для раннього виявлення, своєчасна діагностика і комплексне лікування РГЗ [1].

РГЗ сьогодні визначається як група захворювань з варіабельною морфологією, молекулярними особливостями, поведінкою та відповіддю на терапію [3, 4]. Зі збільшенням можливостей лікування в епоху прецизійної медицини традиційні клініко-патологічні прогностичні змінні і встановлені молекулярні прогностичні маркери виявилися недостатніми для відображення

такого ступеня гетерогенності. Необхідний пошук додаткових молекулярних маркерів для персоналізованого підходу до терапії, а для вдосконалення лікування раку необхідні прогностичні біомаркери.

Точна прогностична стратифікація дозволяє визначити одну групу пацієнтів зі сприятливим прогнозом, які не потребують токсичної системної терапії, і другу групу з несприятливим прогнозом, які потребують більш агресивних форм терапії. Для останньої групи використання прогностичних маркерів допоможе визначити тип терапії, який можна запропонувати для покращення результату та мінімізації ризику несприятливих побічних ефектів. У звичайній діагностичній практиці HER2/neu та гормональні рецептори залишаються основними прогностичними чинниками для вибору таргетної терапії при РГЗ і надають деяку прогностичну інформацію, але, незважаючи на це, існують ще не вирішені проблеми. За даними досліджень понад 50% випадків РГЗ класифікуються як люмінальні (позитивні на рецептор естрогенів і HER2/neu негативні) пухлини [5]. Але, незважаючи на відносно позитивний перебіг, поведінка цих пухлин дуже мінлива, а деякі з них пов'язані з поганим прогнозом і потребують системного лікування у формі хіміо- або таргетної терапії, на додаток до гормональної. Крім того, є дані, що ендокринна терапія люмінального А РГЗ зменшує частоту рецидивів протягом 10 років приблизно на 50% і зменшує 15-річну смертність на третину [6], але частина ER-позитивних пухлин не реагує на лікування [7], що вказує на те, що інші гени і шляхи залучені до визначення відповіді та поведінки цих пухлин. Виявлення таких прогностичних підгруп і вибір відповідної терапії залишається у центрі уваги багатьох дослідницьких проектів. Також визнано, що HER2/neu-позитивний РГЗ, який становить 12-20%, і потрібний негативний, який діагностується у 15-20% РГЗ, є агресивними пухлинами з несприятливим результатом, у тому числі в пацієток молодшої вікової групи [8]. Відповідно до консенсусу St Gallen 2013 гістологічна оцінка надає значну прогностичну інформацію на додаток до підтипів РГЗ [9].

Зі зростанням витрат на охорону здоров'я та впровадженням нових цільових методів лікування, використання біомаркерів значно покращило діагностику РГЗ, прогнозування терапевтичної відповіді та нагляд за пацієнтами під час і після лікування.

За останні десятиліття багатьма науковими центрами проведено значну кількість досліджень з вивчення нових прогностичних чинників на основі молекулярної характеристики пухлин у хворих на РГЗ. Визначення геномних порушень, детермінуючих розвиток пухлини, ступінь її злоякісності, метастатичний потенціал і швидкість прогресії, є пріоритетною областю молекулярно-генетичних досліджень у сучасній онкології. Інший тип молекулярних маркерів, які останнім часом активно використовуються у клінічній практиці, - це імуногістохімічні маркери, що є білковими молекулами, які в свою чергу є продуктами експресії генів, що активно беруть участь у процесі канцерогенезу [10-14].

У зв'язку з цим на чільне місце в прогнозуванні пухлин виходить молекулярна морфопатологія, яка враховує наявність чи відсутність онкогенів і супресорів пухлинного росту (молекулярно-біологічних маркерів) у клітинах. Відмінності в експресії таких маркерів, як епітеліальний кадгерин (Е-кадгерин), що відіграє важливу роль у процесі клітинної адгезії, є потужним супресором інвазії та метастазування, циклооксигеназа-2 (COX-2) і її важлива роль у пухлинній трансформації, проліферації клітин і неоваскуляризації, розподіл інфільтруючих пухлину лімфоцитів, щільність та інтенсивність їх експресії, можуть пояснити, чому порівнювані за поширеністю і гістологічною структурою пухлини відрізняються за агресивністю перебігу захворювання.

Таким чином, встановлення взаємозв'язків між клінічними особливостями РГЗ, гетерогенністю будови інвазивного компонента і стромальної запальної реакції, та показниками, що характеризують біологічні властивості пухлин різних молекулярних підтипів, дасть змогу встановити критерії, які допоможуть передбачити несприятливий перебіг захворювання і

стануть основою до персоніфікованого лікування для запобігання розвитку метастазів у хворих на РГЗ.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота є фрагментом НДР кафедри патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького «Вивчення патоморфологічних особливостей захворювань щитоподібної залози, серцево-судинної, травної, сечовидільної та репродуктивної систем і перинатального періоду з метою удосконалення їх морфологічної діагностики» (№ державної реєстрації 0118U000100, термін виконання 2018-2022 роки) і «Вивчення патогенетичних механізмів та патоморфологічних особливостей захворювань ендокринної, серцево-судинної, дихальної, нервової, травної, сечовидільної та репродуктивної систем з метою удосконалення їх морфологічної діагностики» (№ державної реєстрації 0123U201668, термін виконання 2023-2027 роки). Тема дисертації затверджена на засіданні вченої ради медичного факультету №2 Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького (протокол №3 від «20» листопада 2019 року).

Автором самостійно виконано гістологічні, імуногістохімічні та морфометричні дослідження інфільтративного протокового раку грудної залози.

Мета роботи – підвищення якості діагностики інфільтративного протокового раку грудної залози шляхом визначення клініко-морфологічних, ультраструктурних та імуногістохімічних особливостей молекулярних підтипів та встановлення їх зв'язку із прогностичними чинниками перебігу захворювання.

Завдання дослідження:

1. За матеріалами історій хвороби й амбулаторних карт розподілити випадки інфільтративного протокового раку грудної залози за молекулярними підтипами (люмінальний А, люмінальний В, HER-2/неу позитивний, потрійний негативний).

2. Дослідити особливості гістологічної будови та ультраструктури інфільтративного протокового раку грудної залози залежно від молекулярного підтипу пухлини.
3. Визначити біологічну активність структур інвазивного компонента пухлини за допомогою визначення імуногістохімічної експресії маркерів Ki-67 (проліферативної активності), E-кадгерину (клітинної адгезії), COX-2 (циклооксигенази-2), CD31 (неоангіогенезу) в залежності від молекулярного підтипу пухлини.
4. Оцінити розподіл інфільтруючих пухлину Т-і В-лімфоцитів та НК-клітин в різних молекулярних підтипах інфільтративного протокового раку грудної залози.
5. Дослідити кореляційні та поєднані взаємозв'язки між експресією маркерів, що характеризують інвазивні властивості пухлини, і відомими прогностичними чинниками перебігу захворювання.
6. Встановити прогностичні рівні пухлино-інфільтруючих лімфоцитів в різних молекулярних підтипах інфільтративного протокового раку грудної залози.

Об'єкт дослідження: інфільтративний протоковий рак грудної залози.

Предмет дослідження: молекулярні підтипи, клініко-морфологічні та ультраструктурні особливості, імуногістохімічне дослідження експресії маркерів в пухлинній тканині, прогностичні чинники перебігу різних молекулярних підтипів інфільтративного протокового раку грудної залози.

Методи дослідження: патоморфологічні, імуногістохімічні, морфометричні дослідження; світлова та електронна мікроскопія; статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів

Вперше встановлено, що інфільтративна протокова карцинома грудної залози демонструє гетерогенність морфологічної будови та ультраструктури інвазивного компонента залежно від молекулярно підтипу. Показано, що люмінальний А і В раки грудної залози різноманітні за морфологічною будовою інвазивного компонента, а достовірне переважання морфологічних

структур одного типу визначено в потрійному негативному раку грудної залози в 1,9 разу порівняно з Her-2/neu+, у 5 разів – порівняно з люмінальним А підтипом, в 4,4 разу – порівняно з люмінальним В підтипом ($p < 0,05$).

Доповнено наукові дані про ультраструктуру поверхні клітин інфільтративного протокового раку грудної залози. Встановлено, що зменшення або відсутність асиметричних мікроворсинок на поверхні клітин виявлялися при G2 і G3 ступенях злоякісності пухлин.

Визначено рівні експресії E-кадгерину, COX-2, CD31, лімфоїдної запальної інфільтрації в молекулярних підтипах інфільтративного протокового раку грудної залози і їх зв'язок з відомими прогностичними чинниками. Встановлено часткову або повну втрату експресії E-кадгерину і надмірну експресію COX-2 у пухлинах потрійного негативного та Her-2/neu+ молекулярних підтипів, G2 і G3 ступенів диференціації, з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів, що підтверджується достовірними кореляційними зв'язками. Уточнено наукові дані про морфологію мікросудин в інвазивному компоненті потрійного негативного і Her2/neu+ молекулярних підтипів – наявність множинних атипових дилатованих капілярів і структур з частковою ендотеліальною вистилкою в інтратуморальній стромі.

Уперше встановлено особливості лімфоїдного мікрооточення та оцінено розподіл інфільтруючих пухлину Т-і В-лімфоцитів та НК-клітин в різних молекулярних підтипах, свідченням чого є достовірне переважання щільності розподілу Т- і В-лімфоцитів внутрішньопухлинно і біля інвазивного краю в нелюмінальних підтипах в порівнянні з люмінальними А і В; щільність розподілу внутрішньопухлинних Т-лімфоцитів була найвищою в потрійному негативному раку і значно достовірно переважала за щільність в люмінальному підтипі А ($p < 0,01$).

Досліджено кореляційні та поєднані взаємозв'язки між експресією маркерів, що характеризують інвазивні властивості пухлини, і відомими прогностичними чинниками перебігу захворювання. Встановлено множинний поєднаний взаємозв'язок, який демонструє, що в карциномах G3 потрійного

негативного підтипу спостерігається низька експресія E-кадгеринів і зростає частка CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів. У люмінальному A підтипі встановлено поєднаний взаємозв'язок між високою експресією E-кадгерину, низькою щільністю CD3 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини і морфологічною будовою інвазивного компонента переважно з двох різних типів структур.

Моделювання прогностичних рівнів пухлино-інфільтруючих лімфоцитів при різних молекулярних підтипах інфільтративного протокового раку грудної залози дало змогу спрогнозувати значення показників CD3, CD20, CD56 для пацієнтів кожної групи залежно від поданих чинників. У 77,6% випадків потрійного негативного підтипу наявність пухлини розміром T2 ($p=0,013$), ступінь диференціації пухлини G ($p=0,0003$) і високий рівень експресії COX-2 буде мати прямий вплив на значення показника CD3 на інвазивному краї. У хворих з люмінальним A підтипом у 95,4% випадків доведений сильний вплив чотирьох незалежних предикторів на значення показника CD20 на інвазивному краї: стадія пухлини T1 ($p=0,0000$), метастатичне ураження лімфатичних вузлів (N, $p<0,0001$), переважання різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті ($p=0,0000$) і наявність структур з частковою ендотеліальною вистилкою ($p=0,037$).

Практичне значення отриманих результатів

Розроблено та впроваджено в практику спосіб оцінки пухлинних судин в інфільтративному протоковому раку грудної залози. Це полягає в тому, що наявність в потрійному негативному і Her2/neu+ підтипах множинних атипових дилатованих капілярів і структур з частковою ендотеліальною вистилкою в інтрамуральній стромі є провідним несприятливим морфологічним прогностичним чинником (Інф. лист, 2023).

Доведено необхідність встановлення морфологічних особливостей інвазивного компонента і внутрішньопухлинної гетерогенності в протоковому раку грудної залози. Це полягає в тому, що наявність одночасно різних типів морфологічних структур: альвеолярних, солідних, трабекулярних, тубулярних

та окремих груп пухлинних клітин, характерні для люмінального А підтипу, а переважання морфологічних структур одного типу (солідних чи трабекулярних) – характерні для потрійного негативного підтипу, тобто для різних за прогнозом клінічних груп.

Запропоновано виділення пухлин з надмірною експресією COX-2 в окрему групу на основі дослідження та оцінки експресії, так як надмірна експресія COX-2 асоціювалася з потрійним негативним та Her-2/neu+ фенотипами з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів.

Результати дослідження дозволяють проаналізувати можливість прогнозування перебігу захворювання на основі визначення рівня експресії E-кадгеринів в пухлинній тканині та порівняння за експресією в люмінальних та нелюмінальних підтипах.

Запропонована регресійна мультифакторна модель дозволяє спрогнозувати значення показників CD3, CD20, CD56 в інфільтративному протоковому раку грудної залози залежно від поданих факторних ознак, що має медичне та економічне значення, дасть змогу приймати оперативне рішення стосовно лікування без очікування результатів дороговартісних досліджень.

Результати наукового дослідження з позитивним ефектом впроваджені в практичну роботу Західноукраїнської гістологічної лабораторії, патологоанатомічного відділення Львівського онкологічного регіонального лікувально-діагностичного центру, патологоанатомічного відділення комунального підприємства «Рівненська обласна клінічна лікарня імені Юрія Семенюка» Рівненської обласної ради. Нові теоретичні положення дисертаційної роботи використовуються у навчальному процесі на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України, у науковій роботі лабораторії електронної мікроскопії Львівського національного медичного університету ім. Данила Галицького МОЗ України.

Особистий внесок здобувача

Дисертація є самостійно виконаним науковим дослідженням здобувача. Разом з науковим керівником визначена тема дисертаційної роботи, сформульована мета, завдання і дизайн дослідження. Здобувачем самостійно проведений інформаційний і патентний пошук, аналіз наукової літератури за темою дисертації. Автором опрацьований весь матеріал, представлений у роботі, самостійно проведені клініко-морфологічні зіставлення молекулярних підтипів інфільтративного протокового раку грудної залози, визначені особливості гістологічної будови та ультраструктури, морфометричні параметри, біологічна активність структур інвазивного компонента, проведене теоретичне узагальнення отриманих результатів. Дисертантом виконана статистична обробка фактичного матеріалу, написані та проілюстровані всі розділи дисертації, сформульовані висновки. Матеріали досліджень прийняті та опубліковані у фахових періодичних наукових виданнях.

У роботах, виконаних у співавторстві, реалізовані наукові ідеї здобувача. Дисертантом не були використані результати та ідеї співавторів публікацій, права співавторів не порушені, конфлікт інтересів відсутній.

Апробація результатів дисертації

Основні положення дисертації було представлено та обговорено на 14th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists (May 10-13th, 2018, Warsaw, Poland); XVII Конгресі Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (м. Тернопіль, 20-21 вересня 2018 року); X Конгресі Асоціації патологів України (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 року); міжнародній науково-практичній конференції «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 року); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI ст.» (м. Львів, 25–26 травня 2019 року); підсумковій LXII науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини, присвяченій 165-річчю від Дня народження Івана Яковича Горбачевського» (Тернопіль, 13 черв. 2019 р.); міжнародній науково-

практичній конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини» (м. Львів, 21–22 червня 2019 року); 3rd International scientific and practical conference (24-26 May, Athens, Greece. 2020); міжнародній науково-практичній конференції «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки та практики» (м. Одеса, 15-16 травня 2020 р.); міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI ст.» (м. Львів, 22–23 травня 2020 р.); XVIII Конгресі Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (СФУЛТ) (м. Львів, 1-3 жовтня 2020 р.); International scientific conference "Medicine and health care in modern society: actual problems and modern aspects" (February 26-27, 2021. Lublin, Poland); 17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide (17–21 March 2021); International scientific and practical conference "Scientific progress of medicine and pharmacy of the EU countries" (April 23-24, 2021, Częstochowa, Poland); XXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Patologów (13-15.10.2022, Poznan,); 18th St. Gallen International Breast Cancer Conference (Vienna 15-18.03.2023); 7th International scientific and practical conference (March 29–31, 2023. Boston, USA, 2023). Відомості про апробацію результатів дисертації наведено у Додатку Б.

Публікації

Наукові публікації охоплюють усі розділи дисертаційної роботи. За темою дисертації опубліковано 29 наукових праць, в тому числі 9 статей, з них 1 стаття в колективній монографії, виданій закордоном (Collective monograph Medical University of Lublin, Poland), 2 статті – у закордонних фахових наукових виданнях, що входять у наукометричну базу Scopus, 2 статті – у закордонних фахових наукових виданнях держави, яка входить до Організації економічного співробітництва та розвитку і Європейського Союзу (Польща), 4 статті – у фахових наукових виданнях, рекомендованих МОН України; 18 робіт – у матеріалах конгресів і конференцій, зокрема 9 з них – зарубіжні (Варшава-Польща, Афіни-Греція, Люблін-Польща, Санкт-Галлен-Швейцарія, Ченстохова-Польща, Бостон-США), 9 – вітчизняних з міжнародною участю; 2

статті – в інших виданнях, 1 інформаційний лист про нововведення. Перелік усіх публікацій із вказівкою особистої участі наведений у Додатку А.

Структура та обсяг дисертації

Дисертаційна робота викладена українською мовою на 269 сторінках друкованого тексту, з них 164 сторінки займає основна частина, оформлена згідно існуючих вимог. Дисертація складається із анотацій українською та англійською мовами, переліку публікацій здобувача, вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, висновків, списку використаних джерел і додатків. Список використаної літератури містить 274 джерела на 33 сторінках. Робота ілюстрована 71 рисунком на 38 сторінках, містить 21 таблицю на 13 сторінках, додатки – на 20 сторінках.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО МОРФОЛОГІЧНІ ТА КЛІНІКО-БІОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПІВ ІНФІЛЬТРАТИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ ЗНАЧЕННЯ ДЛЯ ПРОГНОЗУ (огляд літератури)

1.1 Рак грудної залози – актуальна медична проблема сьогодення

Рак грудної залози (РГЗ) є найчастішою на сьогоднішній день злоякісною пухлиною у жінок [1, 15]. Захворюваність і смертність продовжують і далі зростати, незважаючи на значне покращення ранньої діагностики та застосування післяопераційної ад'ювантної терапії [16]. Злоякісна патологія залишається актуальною не тільки в масштабах окремої країни, але й для світової спільноти, оскільки високий рівень захворюваності реєструється у когортах жіночого населення репродуктивного віку, що безумовно має вплив на демографічну ситуацію. РГЗ є основною причиною смерті від раку серед жінок у всьому світі. За даними ВООЗ, у світі тільки в 2020 році РГЗ був діагностований у 2,3 мільйона жінок, при тому що було зареєстровано 685 тис. випадків смерті від даної хвороби [1]. У США в 2021 році зареєстровано понад 281 550 нових випадків інвазивного РГЗ, і 43 600 жінок померли від хвороби за цей період часу [17].

Рак грудної залози є однією з найпоширеніших злоякісних пухлин у європейській популяції. За оцінками експертів, на РГЗ припадає 13,3% усіх нових випадків раку, діагностованих у країнах ЄС-27 у 2020 році, що робить його найпоширенішим видом раку серед населення ЄС. За підрахунками фахівців, на його частку припадає 28,7% усіх нових випадків раку у жінок [18].

За показником захворюваності жіночого населення України РГЗ також зберігає тенденцію до зростання. Згідно даних Національного канцер-реєстру тільки у 2020 р. в Україні на РГЗ захворіли 12164 жінки і померли 5156, тобто на кожні 10 нових випадків РГЗ зареєстровано 4 смерті від нього. Пікові

значення показника захворюваності жінок на РГЗ зареєстровані у вікових групах 65-74 років, смертності – у вікових групах 65-84 роки [2]. Питома вага РГЗ у структурі смертності від злоякісних новоутворень жіночого населення України є найбільшою і складає 20,1%, випереджує смертність від злоякісних новоутворень ободової кишки (8,4%), шлунку (7,5%), трахеї, бронхів, легені (6,6%), прямої кишки (6,4%), яєчників (6,4%), шийки матки (5,9%), підшлункової залози (5,8%), тіла матки (5,7%), неуточненої первинної локалізації (2,9%).

За даними ВООЗ головною метою боротьби з РГЗ є зниження глобальної смертності від цієї злоякісної патології на 2,5% на рік, запобігаючи тим самим 2,5 мільйонам смертей у всьому світі в період між 2020 і 2040 роками. Зменшення глобальної смертності від раку грудної залози на 2,5% в рік дозволить уникнути до 2030 року 25% смертей і до 2040 року 40% смертей серед жінок віком до 70 років. Для досягнення цих цілей, на думку експертів, необхідне раннє виявлення, своєчасна діагностика і комплексне лікування РГЗ [1]. Все це підкреслює важливість РГЗ не тільки як загальносвітової проблеми сучасної медицини, але і як глобальної соціально-значущої патології.

1.2 Молекулярні підтипи інфільтративного протокового раку грудної залози

Згідно з класифікацією ВООЗ злоякісні епітеліальні пухлини грудної залози поділяються на кілька гістологічних типів, які визначені за їхніми унікальними цитологічними та гістологічними особливостями [19-21]. Серед них найпоширенішим РГЗ є інвазивна карцинома неспецифічного типу, також відома як інфільтративна протокова карцинома, на яку припадає 70–80% усіх видів РГЗ [22, 23]. Згідно з даними 5-го видання класифікації пухлин грудної залози ВООЗ, інфільтративна протокова карцинома демонструє гетерогенність з точки зору клінічних характеристик, лікування та прогнозу, які значною мірою визначаються внутрішнім молекулярним підтипом, визначеним експресією генів [24-29].

Аналіз масивів експресії генів призвів до розпізнавання кількох принципово різних підтипів РГЗ [24]. Оскільки не завжди можливо отримати інформацію про масив експресії генів, в основному через фінансові причини, спрощену класифікацію, що точно відповідає класифікації, запропонованій Cheang MС. al. [30], було прийнято до широкого використання в клініці. Цей підхід використовує імуногістохімічне виявлення ER та PR, виявлення надекспресії мембранного білка HER-2/neu або ампліфікацію відповідного гена – онкогену HER-2/neu, а також визначення індексу Ki-67, маркера проліферації клітин, як засобів ідентифікації підтипів пухлини. Раніше Ki-67 не включався до маркерів, за якими визначали молекулярні підтипи раку грудної залози [31-34], а в 2009 році на конференції в Санкт-Галлені був рекомендований в якості біомаркера прогнозу і чутливості ракових клітин до гормональної або хіміотерапії.

Таким чином, для визначення адекватної тактики лікування використовується молекулярно-генетична класифікація РГЗ, запропонована в Perou СМ. і співав. [24], яка заснована на виділенні за допомогою кластерного аналізу групи з 465 генів, що розподіляються на чотири експресійних патерни і відповідають люмінальному А, люмінальному В, HER-2/neu позитивному і потрібно негативному РГЗ. Їх визначення відіграє вирішальну роль у прогнозі захворювання та виборі методів ад'ювантної, неоад'ювантної і таргентної терапії РГЗ [35].

Люмінальний А підтип характеризується наявністю експресії ER та PR, відсутністю експресії HER-2/neu та низьким індексом проліферативної активності (Ki-67 менше 20%). В даний час статус рецепторів до естрогенів (ER) і прогестерону (PR) є важливим предиктивним маркером, що має також і прогностичне значення [36-38]. За даними літератури, приблизно у 70% пацієток з РГЗ виявляється позитивна експресія ER [39, 40]. Ад'ювантна ендокринна терапія тамоксифеном або інгібіторами ароматази є стандартом лікування цієї групи пацієток [41, 42]. При позитивному статусі ER прийом тамоксифену протягом 5 років знижує коефіцієнт смертності від РГЗ більш ніж

на 30 %, незалежно від застосування хіміотерапії та віку пацієнтів. Призначення інгібіторів ароматази додатково покращувало безрецидивну виживаність, зменшуючи ризик появи віддалених метастазів і, в деяких випадках, збільшуючи загальну виживаність [43-45]. У той же час слід зазначити, що 30-40% жінок з позитивним статусом ER не реагують на тамоксифен [40], що може свідчити про біологічну гетерогенність естроген-позитивних пухлин.

Люмінальний тип В зустрічається у 15-20% випадків РГЗ, відрізняється від люмінального А відсутністю експресії одного з гормональних рецепторів. Залежно від HER-2/neu статусу та проліферативної активності поділяється на два варіанти: з експресією Ki-67 більше 20% у поєднанні з негативним HER-2/neu статусом і з позитивною експресією HER-2/neu, незалежно від рівня Ki-67. У порівнянні з люмінальним А підтипом, частіше супроводжується метастатичним ураженням лімфатичних вузлів та рецидивуванням. Ці новоутворення частіше є нечутливими до хіміо- та гормональної терапії, але чутливі до трансстимуабу у випадках з позитивною експресією HER-2/neu. Даний підтип відрізняється несприятливим прогнозом, схильністю до місцевих та системних рецидивів захворювання [46-48] і часто вимагає призначення таргетних препаратів при лікуванні [49, 50].

HER-2/neu позитивний (нелюмінальний) – агресивний молекулярний підтип РГЗ. При імуногістохімічному дослідженні визначається негативна експресія рецепторів до статевих гормонів, позитивна експресія HER-2/neu, високий проліферативний індекс (експресія Ki-67 понад 20%). HER-2/neu – протоонкоген, який належить до групи рецепторів тирозин-кінази, кодує рецептор 2 людського епідермального фактора росту (c-erbB-2). Гіперекспресія HER-2/neu зазвичай є результатом генної ампліфікації, яка спостерігається у 10-25% пацієнтів з РГЗ і призводить до активації внутрішньоклітинних сигнальних каскадів MAPK, PI3/Akt, JAK/STAT та посилення процесів клітинної проліферації, ангиогенезу та метастазування [47, 51]. Важливість визначення цього маркера пов'язана з тим, що в даний час

існують таргентні препарати, представлені моноклональними антитілами проти HER-2/neu, такими як трастузумаб (герцептин), рапатиніб (Tyverb/Tykerb) та інші. Їх використання дало новий крок у лікуванні HER-позитивного РГЗ [52-55]. Більшість дослідників відзначили, що пухлини грудної залози, які мають HER-2/neu-позитивний статус, вирізняються більш агресивним перебігом і асоціюються з несприятливим прогнозом. Клінічно для таких пухлин характерний великий розмір, часте залучення до метастатичного процесу лімфатичних вузлів, низькі показники загальної виживаності. Також відзначено зв'язок цього маркера зі ступенем злоякісності пухлини (Grade) і гістологічним типом пухлини [46-48, 51].

Потрійний негативний фенотип характеризується відсутністю експресії ER, PR, HER-2/neu, CK 5/6 та EGFR при застосуванні генного та імуногістохімічного аналізу, становить від 10 до 20% серед підтипів [56, 57]. Поширеність потрійних негативних пухлин становить 15-23% у пацієнтів віком до 40 років, 16-30% для пацієнтів віком 40-49 років і 11-54% для пацієнтів старше 50 років [58, 59]. Оцінка молекулярного профілю у великих серіях продемонструвала, що потрійні негативні пухлини відносять до базально-подібних та некласифікованих пухлин. Діагностика цих пухлин має перевагу в тому, що ER, PR і HER-2/neu вже рутинно використовуються в імуногістохімії для визначення терапевтичної стратегії. Про агресивний характер цього типу пухлини говорять рецидиви, які виникають протягом перших трьох років, а більшість летальних випадків припадає на перші 5 років після терапії [60]. Несприятливий прогноз також підтверджується тим, що більшість потрійних негативних випадків мають гістологічний ступінь диференціації G3, на них припадає до 77%-96,8% випадків [56, 57, 59, 60]. Крім того, в потрійних негативних пухлинах часто виявляється мутація гена BRCA1 [61]. Більшість досліджень свідчать про те, що потрійний негативний рак є незалежним несприятливим прогностичним фактором [48, 61-63].

Таким чином, широке застосування експресійної класифікації зумовлене тим, що представлені вище типи РГЗ не тільки відрізняються набором певних

молекулярних маркерів, вони характеризуються різною біологією, прогнозом перебігу, чутливістю до різних видів терапії. На основі значної кількості досліджень доведено, що молекулярний тип є незалежною прогностичною ознакою, яка передбачає ефективність проведеної терапії [64-67].

1.3 Клініко-морфологічні прогностичні чинники перебігу інфільтративного протокового раку грудної залози

Зі збільшенням можливостей лікування РГЗ в епоху прецизійної медицини продовжуються дослідження клінічних, морфологічних, імуноморфологічних прогностичних чинників цієї злоякісної гетерогенної патології, що є головною стратегією для розуміння розвитку і перебігу захворювання, для оцінювання персоналізованого підходу і прогнозу, а також для ймовірної відповіді на специфічну терапію. Відомо, що прогностичні чинники корелюють з виживаністю хворих і не залежать від призначеного лікування, в той час, як предиктивні чинники передбачають відповідь на терапію, незалежно від прогнозу перебігу захворювання. З удосконаленням знань про біологічні особливості пухлинного процесу панель чинників щодо прогнозу збільшується [68] Таким чином, сучасним напрямом терапії хворих на РГЗ є індивідуалізація (персоніфікація) лікування на підставі удосконалення знань щодо біологічних особливостей пухлинного процесу з пошуком чинників, які характеризують прогресування пухлинного процесу і прогноз перебігу РГЗ.

Мультидисциплінарною групою клініцистів, патологоанатомів і статистиків різні прогностичні та предиктивні чинники РГЗ були розкласифіковані на категорії, що відображають чисельність опублікованих доказів. Чинники були ранжовані відповідно до раніше встановленого категорійного рейтингу Коледжу американських патологів: категорія I, чинники, що мають прогностичну цінність і корисні для клінічного ведення пацієнтів; категорія II, чинники, які були детально вивчені біологічно та клінічно, але їх важливість ще не підтверджена статистично надійними

дослідженнями, і категорія III, всі інші чинники, недостатньо вивчені, щоб продемонструвати їх прогностичну цінність. Чинники категорій I і II були враховані з огляду на відмінності в методах аналізу, інтерпретації результатів, звітності даних та статистичної оцінки. Категорія I включала інформацію про стадії класифікації (TNM), ступінь диференціації (G), гістологічний тип, кількість мітотичних фігур і статус гормональних рецепторів. Чинники категорії II включали HER2/neu (ампліфікація гена HER2/neu), маркери проліферації, інвазію лімфатичних і кровоносних судин, p53. Чинники категорії III включали аналіз плоідності ДНК, щільність мікросудин, EGFR, трансформуючий фактор росту- α , онкопротеїн BCL2, pS2 і катепсин D, E-кадгерин та ін. [69].

Найбільш важливими, за даними інших авторів, є такі клінічні, морфологічні і біологічні прогностичні чинники, як вік пацієнток, стан менструальної функції, стадія захворювання, розмір пухлини, ступінь гістологічної злякисності, проліферативна активність пухлинних клітин, характеристики тканини по краю резекції, ураження судин пухлинними клітинами, інфільтрація оточуючих тканин, рецепторний статус і статус регіонарних лімфатичних вузлів [68].

Вік хворих має велике значення для перебігу і прогнозу РГЗ. Молодий вік є значущим прогностичним фактором у жінок з люмінальним підтипом РГЗ [70-72]. Крім того, дослідження також показали, що при тричі негативному РГЗ вікова група <40 років значно пов'язана з несприятливим прогнозом [73, 74]. Більш агресивне захворювання може проявлятися у молодших пацієнтів, оскільки попередні дослідження показали, що хворі <40 років мають вищий гістологічний ступінь, більш високу стадію пухлини та гіршу біологічну поведінку пухлини [75-78]. Є дані, що смертність від РГЗ у молодих пацієнток (віком до 50 років) становить 32%, а у жінок 60-69 років – 8% [79]. Було показано, що молодші пацієнти з люмінальним А підтипом РГЗ мають більш високу частоту ендокринної резистентності [80-82]. Навіть при лікуванні ендокринною терапією вони все одно можуть мати несприятливий прогноз

через резистентність до тамоксифену [80, 83]. Пацієнти віком від 65 років становлять біля половини випадків люмінального підтипу РГЗ [84]. При цьому з настанням менопаузи у жінок збільшується не тільки ризик розвитку злоякісних новоутворень в грудних залозах, а й ризик розвитку супутньої патології, зокрема серцево-судинної, яка може бути основною причиною смерті літніх пацієток [85]. При виборі лікування для людей похилого віку слід враховувати вихідний стан пацієнта, а також очікувану користь і токсичність кожного лікування. Слід також враховувати вплив токсичності лікування на якість життя та працездатність пацієнта. У дослідженнях також повідомлялося, що літні пацієнтки рідше отримують стандартне лікування, включаючи хірургічну терапію, хіміотерапію, додаткову променеви терапію та ендокринну терапію. Пацієнти похилого віку часто мають інші основні проблеми зі здоров'ям і можуть страждати від більш серйозних побічних ефектів при прийомі стандартної терапії, що може підвищити смертність від захворювання у пацієнтів літнього віку [86]. Розробка індивідуальних стратегій лікування для пацієнтів різного віку може бути життєздатним напрямком майбутніх досліджень з додатковим акцентом на посилене лікування молодих пацієнтів. Численні дослідження підтверджують, що вік на момент встановлення діагнозу є незалежним прогностичним чинником РГЗ [76].

Важливим чинником прогнозу перебігу РГЗ і його агресивності є розмір пухлинного вузла. За даними авторів частота регіонарного метастазування при розмірі інфільтративного протокового раку менше 5 мм становить 15-20%. А вже при розмірі пухлини 5-10 мм частота регіонарного метастазування збільшується вже до 40-50%. Розмір первинної пухлини вважається незалежним прогностичним чинником не тільки лімфогенного метастазування, але й гематогенного. Авторами доведено різні ризики розвитку гематогенних метастазів. Високий ризик гематогенного метастазування при розмірах первинного пухлинного вузла в межах 2-5 см, а дуже високий ризик - при розмірах первинного пухлинного вузла більше 5 см

[87-90]. Також важливе значення має кількість уражених регіонарних лімфатичних вузлів для загальної і безрецидивної виживаності. Ураження чотирьох і більше лімфатичних вузлів підвищує ризик розвитку віддалених метастазів [91, 92]. Отже, наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах є важливим прогностичним критерієм перебігу РГЗ [93-98].

За даними проведених багатьох досліджень, до найважливіших чинників, що визначають регіонарне метастазування, відносять гістологічну форму раку грудної залози, виразність інвазивного компонента і ступінь диференціювання пухлини G (від високого G1 до низького ступеня диференціювання G3) [99]. Ступінь диференціації G позитивно корелює з темпами росту пухлини, проліферативною активністю Ki-67, має зв'язки з експресією ER, PR, Her-2/neu. Наприклад, при ступені диференціювання G1, тобто при високодиференційованих пухлинах, частота лімфогенного метастазування менша, ніж у випадках помірнодиференційованих і низькодиференційованих карцином, а ризик віддаленого метастазування є набагато нижчий, якщо порівняти зі ступенями G2 і G3 [100].

Додатковими несприятливими критеріями прогнозу віддаленого метастазування при РГЗ є інтраваскулярна інвазія, периневральний ріст і великі некрози пухлинної тканини [101]. Крім вивчення стану паренхіматозного компонента пухлини, приділяється увага стромі новоутворення. Злоякісна трансформація пухлинних клітин супроводжується або навіть передуює змінам у навколишній стромі. Стромальний компартмент гістологічно є невід'ємною частиною пухлинної тканини і складною композицією різних типів клітин, включаючи волокнисті структури, фібробласти, імунні клітини, судини і позаклітинний матрикс. Існують вагомі докази того, що пухлиноутворення контролюється складною взаємодією між пухлинними клітинами та елементами стромі, і численні експериментальні дослідження свідчать про те, що стромальний компартмент пухлини має вплив на саму пухлину [102]. Відповідно до цього було виявлено багато особливостей стромі, які пов'язані з агресивністю пухлини і в кінцевому

підсумку впливали на перебіг РГЗ [103, 104]. Таким чином, обґрунтовано концепцію, згідно з якою розвиток стромі пухлини підтримує пухлинний генез, і що ці зміни можна використовувати як прогностичні або предиктивні біомаркери [105, 106].

На сьогоднішній день широко обговорюється прогностичне значення запальної інфільтрації у стромі новоутворення. Запальний інфільтрат в мікрооточенні пухлини складається з безлічі популяцій клітин, які чинять різноманітний вплив на пухлинні клітини, починаючи від стимулювання розвитку пухлини аж до пригнічення її росту. Взаємодія пухлинних та імунних клітин відбувається в результаті прямого міжклітинного контакту або опосередковано молекулами, що походять з імунокомпетентних клітин, наприклад рецептори, цитокіни і хемокіни. Науковці приділяють увагу вивченню інфільтрації стромі імунокомпетентними клітинами для визначення чутливості до неоад'ювантної (передопераційної) хіміотерапії і її призначення пацієнтам [107-109]. Детально досліджуються субпопуляції Т-лімфоцитів, CD4+ Т-хелперів/індукторів та CD8+ супресорів/цитотоксичних клітин [110-115]. Також повідомляється, що інфільтруючі пухлину В-лімфоцити є джерелом протипухлинних антитіл [116]. В той час, НК-клітини, подібно до Т-клітин, схильні контролювати ріст пухлини та її поширення, завдяки їхньої цитотоксичної активності [117]. Таким чином, на сьогоднішній день, пухлино-інфільтруючі лімфоцити необхідно не тільки включати в діагностичний алгоритм, але й розглядати в якості достовірного прогностичного і предиктивного біомаркера РГЗ.

1.4 Імуногістохімічна характеристика інфільтративного протокового раку грудної залози для оцінки прогностичних чинників

Окрім розробленої і запропонованої Perou SM (2000) молекулярно-генетичної класифікації РГЗ, в наш час проводяться дослідження, які дозволяли би точніше виділяти хворих як зі сприятливим, так і не сприятливим прогнозом перебігу захворювання, на основі прогностичних тестів профілів

пухлин і проведеного лікування, ніж на основі стандартних клініко-морфологічних прогностичних факторів.

Молекулярні біомаркери зазвичай пов'язані з характеристиками пухлинних клітин, у зв'язку з чим є перспективніші, ніж звичайні анатомічні або гістологічні маркери при прогнозуванні прогресування захворювання. В даний час дослідження прогностичних біомаркерів є пріоритетним напрямом в онкології, оскільки вони дозволяють розробити план персоналізованого лікування в кожному конкретному випадку. З метою прогнозування РГЗ найчастіше застосовують одногенні або мультигенні панелі. З одногенних панелей найбільш відомі uPA (Urokinase-Type Plasminogen Activator – активатор плазміногену типу урокінази) і PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor 1 – інгібітор 1 активатора плазміногену), які ґрунтуються на визначенні рівнів протеїнів за допомогою тесту ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ферментний імуносорбентний аналіз) [118].

Низькі рівні цих протеїнів пов'язані з низьким ризиком рецидивування. Більш того, висока експресія таких проліферативних генів, як гени Ki-67, цикліну D, цикліну E, p27 і p21, виміряна за допомогою імуногістохімічного аналізу або кількісного аналізу ДНК у S-фазі клітинного циклу шляхом проточної цитометрії, має прогностичні та предиктивні характеристики, тому що неконтрольована проліферація є однією з характерних рис процесу канцерогенезу.

Оскільки пухлинні клітини надзвичайно гетерогенні, то одного біомаркера недостатньо для точного визначення прогнозу РГЗ, і в даному аспекті найефективнішими є мультигенні сигнатури. Найвідомішою серед мультигенних сигнатур є Oncotype™ DX (Genomic Health, Inc., Редвуд, США), заснована на 21 гені, 16 з яких пов'язані з РГЗ (гени Ki-67, CCNB1, MMP11, HER-2/neu, BCL2, естрогенових рецепторів), а решта 5 генів є для перевірки. Ця сигнатура рекомендована для застосування у пацієток з ранньою стадією РГЗ. Oncotype™ DX застосовується в США і Європі. Впровадження Oncotype DX у клінічній роботі дозволяє знизити відсоток жінок з естроген позитивним

Her2/neu негативним (люмінальним А підтипом) раннім РГЗ, яким могла би бути рекомендована ад'ювантна хіміотерапія на додаток до ад'ювантної гормонотерапії, від третини до половини всіх випадків [119]. Можливість орієнтуватися на дані мультигенної тестової системи Oncotype™ DX для оцінки ризику рецидиву у пацієток з люмінальним без гіперекспресії Her2/neu РМЗ схвалена такими клінічними спільнотами, як NCCN (National Comprehensive Cancer Network - Національна комплексна онкологічна мережа – це об'єднання 32 онкологічних центрів в США, більшість з яких визначені Національним інститутом раку як комплексні онкологічні центри), ASCO (American Society of Clinical Oncology – Американське товариство клінічної онкології), ESMO (European Society for Medical Oncology – Європейське товариство медичної онкології) та деякими іншими [120]. Тим не менш, одним з важливих факторів, що лімітують широке застосування цих тестів, є висока ціна досліджень. Так, вартість одного аналізу в країнах Європи може варіювати від 1700 до 3800 Євро [121].

Першою сигнатурою, схваленою Управлінням з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США (Food and Drug Administration, FDA) як перший мультипараметричний тест для прогнозування ризику рецидивування при РГЗ, є MammaPrint® (Agendia, BV, Амстердам, Нідерланди - 70-генна сигнатура, також відома як «Амстердамська сигнатура»). Це мультигенна панель, що включає 70 генів, які є відповідальними за проліферацію, метастазування, ангиогенез та характеристику строми, а принцип її роботи ґрунтується на експресії РНК. MammaPrint® допомагає виявити групи пацієток із гіршим та кращим прогнозом. Ще однією панеллю є Роттердамська сигнатура (Veridex, LLC, Warren, NJ, USA - 76-генна «Роттердамська сигнатура») на підставі 76 генів, яка включає функції інших сигнатур (Oncotype™ DX і MammaPrint®), і дозволяє прогнозувати ризик розвитку віддалених метастазів протягом 5 років у хворих без ураження лімфатичних вузлів [122].

На сьогоднішній день в економічно розвинених країнах прогностичні генні тести щораз більше використовуються у клінічній практиці. І це в свою чергу забезпечує зміни в клінічних рекомендаціях щодо схем лікування РГЗ. Але, виходячи з дуже високої вартості комерційно доступних прогностичних генних тестів, у рутинній практиці вони не знайшли широкого використання у багатьох країнах світу. Тому актуальними і дуже важливими є дослідження, в яких за допомогою прогностичних генних тестів і паралельно імуногістохімічних досліджень порівнюються прогноз і достовірність отриманих даних. При отриманні достовірних даних можливе використання стандартних імуногістохімічних методів з огляду на високовартісні прогностичні генні тести.

Імуногістохімія може бути використана для оцінки прогностичних чинників, включаючи молекулярні підтипи, HER-2/neu, гормональні рецептори, маркери проліферації (Ki-67) і маркери лімфоваскулярної інвазії, включаючи ERG (онкогенний ETS-асоційований ген, або ETS-related gene (ERG) кодує фактор транскрипції, який бере участь у регуляції кровотворення, ангиогенезу, васкулогенезу, запалення, міграції та інвазії), CD31, CD34, VIII фактор згортання крові (Віллебранда), судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF) і подопланін.

Обсяг маркерів, які претендують на гіпотетичну прогностичну або предиктивну роль при РГЗ, також включає Cyclin D1, онкопротеїн Bcl-2, P53 протеїн, циклооксигеназу-2 (COX-2), цитокератин 5/6, E-кадгерини, α - і β -катеніни, трансформуючий фактор росту β (TGF- β) та інші. Наприклад, E-кадгерин [123], актин [124] оцінювалися в якості прогностичного маркера на додаток до рутинної діагностики [125, 126]. Циклін D1, онкопротеїн Bcl-2, білок P53 і COX-2 викликають великий науковий і практичний інтерес, оскільки ці білки беруть участь в основних шляхах розвитку пухлини: проліферації клітин і контролі клітинного циклу, уникнення апоптозу, експресії онкопротеїнів через мутації в протоонкогенах та ангиогенезу.

Ki-67 – як прогностичний фактор виживаності хворих на рак грудної залози. Проліферативна активність пухлинних клітин РГЗ є основним показником біологічної поведінки пухлин і корелює зі ступенем злоякісності, вмістом ДНК, клініко-патологічними параметрами і прогнозом захворювання [127, 128]. Оптимальним і широко розповсюдженим методом оцінки проліферативної активності вважаються імуногістохімічні реакції на Ki-67, так як це доступно і технічно менш складно, ніж експресія генного профілювання, понадто Ki-67 експресується у всіх фазах клітинного циклу, окрім G0 [129]. Ki-67 використовується головним чином з метою диференціації люмінального А від люмінального В підтипу, які вимагають різної терапії. Низький проліферативний індекс пов'язаний з люмінальним А підтипом, тоді як люмінальний В пов'язаний з вищими темпами проліферації [129, 130]. На сьогоднішній день індексом Ki-67 для розмежування люмінального А і люмінального В підтипів є 20%. Ki-67 може розглядатися як прогностичний чинник виживаності і як предиктивний чинник для планування променевої і хіміотерапії [131-135]. В результаті проведених досліджень встановлено, що високопроліферативні пухлини асоціюються з несприятливим прогнозом, але з більшою ймовірністю реагують на хіміотерапію [136, 137]. Для слабкопроліферативних пухлин, незважаючи на відсутність реакції на хіміотерапію, низькі показники Ki-67 пов'язані зі сприятливим прогнозом. За результатами інших досліджень, показник Ki-67 був найвищим у молекулярних підтипах – Her-2/neu і люмінальному В. За даними авторів Ki-67 може бути важливим прогностичним і предиктивним маркером у веденні пацієнток. Автори рекомендують регулярно визначати його на зразках РГЗ в діагностичних гістопатологічних лабораторіях, дотримуючись рекомендацій, запропонованих робочою групою з РГЗ, для кращої уніфікації до єдиних стандартів діагностики [138].

Прогностична роль гіперекспресії COX-2 у хворих на рак грудної залози

Науковцями активно досліджується експресія циклооксигенази-2 (COX-2) у передпухлинних утвореннях та злоякісних пухлинах грудної залози,

можливі механізми реалізації та значення експресії і гіперекспресії ензиму для прогнозу РГЗ [139, 140]. Потрібно наголосити, що ферменти циклооксигенази COX-1 і COX-2 мають вирішальне значення в біосинтезі простагландинів з арахідонової кислоти. Раніше було ідентифіковано дві ізоформи COX: COX-1, конститутивна ізоформа; і COX-2, індукційна форма ферменту [141]. Білок COX-1 людини конститутивно експресується у більшості тканин організму і підтримує тканинний гомеостаз. COX-2 є індукованим ферментом у відповідь на багато чинників. COX-2-залежна активність є необхідним компонентом для клітинних і молекулярних механізмів міграції пухлинних клітин та інвазії клітин РГЗ. Активність COX-2 також модулює експресію матричних металопротеїназ, які можуть бути частиною молекулярного механізму, за допомогою якого COX-2 сприяє інвазії та міграції клітин. Дослідження показують, що COX-2 допомагає у визначенні метастатичних сигнальних шляхів, які сприяють прогресуванню РГЗ до метастазування [142].

У літературі повідомляються суперечливі дані щодо частоти надмірної експресії COX-2 при РГЗ, але розбіжності частково можна віднести до різних систем оцінювання. Частота експресії COX-2 у злужкісних новоутвореннях грудної залози значно варіює – від 5 до 100% [143]. У дослідженні van Nes та співавт. експресію COX-2 оцінювали таким чином, що випадки класифікували на групу з низькою експресією або високою щодо середнього значення [144]. В іншому дослідженні 95% карцином грудної залози виявляли цитоплазматичну експресію COX-2 [145]. І, навпаки, надекспресія COX-2 спостерігалася у 46,8% хірургічних зразків карцином [146]. Від помірного до сильного ступеня підвищена експресія білка COX-2 спостерігалася у 37,4% випадків РГЗ за даними A. Ristimäki зі співавт. [147]. У великій групі раку COX-2 був позитивним у 57,3% інвазивних пухлин [148]. Більшість авторів повідомляють про експресію COX-2 в пухлинних клітинах. Однак у своєму дослідженні E. Richardsen E. зі співавт. виявили експресію стромальних ділянок [149]. Спостереження за роллю макрофагів, що індукують експресію COX-2 в клітинах РГЗ [150], узгоджуються з цими висновками, оскільки

підкреслюється важливість стромального компартменту [151]. COX-2 може залучатися до епітеліально-стромальних взаємодій, що сприяє трансформації раку *in situ* в інвазивну пухлину [152].

Вагомими і важливими є результати досліджень експресії COX-2, представлені Присташ Ю.Я і Фецичем Т.Г. (2016), метою яких було вивчити вплив активності COX-2 на появу локального рецидиву та його кореляцію з HER-2/neu, ER, PR. Результати демонструють можливості використання COX-2 як чинника ризику виникнення рецидивів РГЗ. У першій групі даного дослідження пацієнтки отримували радикальне лікування (операція за Мадденом), ад'ювантну хіміотерапію і повторно звертались з приводу появи локального рецидиву РГЗ. Друга група пацієнток була без рецидивів. Так, у першій групі з рецидивами ступінь активності COX-2 і ампліфікації HER-2/neu були більш виражені, ніж ER і PR, що підтверджується статистичною обробкою матеріалу. Авторами встановлено, що між рівнем активності COX-2 та наявністю рецепторів первинної пухлини до епідермального фактора росту HER-2/neu існує достовірний прямий кореляційний зв'язок ($r=+0,83$; $p < 0,05$). При тому, що авторами не виявлено кореляційного зв'язку між рівнем активності COX-2 з ER і PR. При однакових показниках віку, менопаузальному статусі, гістологічній структурі первинної пухлини, стадії захворювання, об'єму лікування простежується кореляційна залежність між рівнем експресії COX-2 і ампліфікації HER-2/neu у групі з рецидивами захворювання [153]. Отже, представлені авторами дані вказують на доцільність виділення COX-позитивних пухлин в окрему групу для оптимізації лікувальної тактики та використання можливостей таргетного контролю експресії ензиму. Крім того, COX-2 може виступати прогностичним фактором появи рецидивів РГЗ [153].

Таким чином, експресія COX-2 є у пухлинах патологічною та індукується різними стимулюючими чинниками. Оскільки експресія COX-2 регулюється цитокінами та факторами росту, фермент відіграє важливу й багатогранну роль у проліферації клітин [154]. Експресія COX-2 пов'язана з

неоваскуляризацією, пригніченням апоптозу, стимуляцією росту клітин та пригніченням імунітету. Існують дані про спільний стимулюючий вплив циклооксигенази-2 з фактором некрозу пухлини-альфа та інтерлейкіном-1 на транскрипцію фактора росту ендотелію судин (VEGF) та його рецепторів, що призводить до неоангіогенезу [155]. Можливості використання СОХ-2 як фактора ризику виникнення рецидивів раку грудної залози представлені в дослідженнях, в яких ризик рецидивування при СОХ-позитивних пухлинах досягає 67%, при СОХ-негативних пухлинах – 24% [156, 157].

Отже, попередні дані вказують на важливу роль СОХ-2 у пухлинній трансформації, проліферації клітин і неоваскуляризації, тому оцінка експресії СОХ-2 є важливим прогностичним чинником перебігу різних молекулярних підтипів раку грудної залози, як і доцільність виділення СОХ-позитивних пухлин в окрему групу для оптимізації лікувальної тактики та використання можливостей таргетного контролю експресії ензиму. Це може бути важливим, особливо для гормональної терапії, оскільки СОХ-2 каталізує перетворення арахідонової кислоти в простагландини, що стимулює ароматазу і, таким чином, утворення естрогенів.

Е-кадгерин – важливий член сімейства кадгеринів і його роль у процесі клітинної адгезії. Одним з маркерів, який може надати додаткову інформацію про біологічну поведінку пухлини, є епітеліальний кадгерин (Е-кадгерин) – важливий член родини кадгеринів, який відіграє провідну роль у процесі клітинної адгезії, є потужним супресором інвазії та метастазування. Вибіркова втрата Е-кадгерину може спричинити дедиференціацію та інвазивність у карциномах людини, що призводить до того, що цей маркер класифікується як пухлинний супресор [158, 159]. Особливу увагу потрібно звернути загалом на сімейство кадгеринів, яке включає класичні, десмосомальні та атипів кадгерини, протокадгерини та асоційовані з кадгеринами сигнальні протеїни [160]. Вони діють як трансмембранні рецептори, що сприяють кальцій-залежній гомофільній (між молекулами одного типу) та гетерофільній (між молекулами різних типів) взаємодії клітин [161]. Кадгерини поділяються на

три типи залежно від своїх структурних особливостей: I, II та III (атипові кадгерини) [161-163].

Особливого значення при розвитку організму в нормі, а також при розвитку злоякісної пухлини надають E-кадгерину (епітеліальний), N-кадгерину (нейрональний) і P-кадгерину (плацентарний), що відносяться до родини класичних кадгеринів (I тип) і VE-кадгерину (судинний ендотеліальний), який відноситься до родини кадгеринів II типу. Кадгерини отримали свою назву від локалізації, в якій вони вперше були виявлені [164, 165]. E-кадгерин – одна з основних молекул клітинної адгезії в епітеліальних тканинах, який кодується геном CDH1, що розташований на 16q22.1 хромосомі [166, 167]. E-кадгерин локалізується на поверхні епітеліальних клітин, бере участь в утворенні адгезивних контактів, і це є характерною особливістю епітеліальних тканин. Дві молекули E-кадгерину прилеглих одна до одної клітин з'єднуються між собою за допомогою позаклітинного домену, який функціонує тільки в присутності іонів Ca^{2+} , і утворюють адгезивні контакти між двома епітеліальними клітинами, в той час як внутрішньоклітинний домен взаємодіє з цитоплазматичними протеїнами, такими як α -, β -, γ -, p120-катенін, беручи участь у сигнальних каскадах [168].

Однією з найважливіших особливостей процесу метастазування є деформація адгезивних контактів неопластичних клітин, опосередкована порушенням експресії кадгеринів [169]. Іншою важливою особливістю цього процесу є реалізація епітеліально-мезенхімальної трансформації (EMT). Цей процес схожий з таким, що здійснюється під час ембріонального розвитку, але його важливою відмінністю є не контрольованість [170]. Епітеліально-мезенхімальна трансформація реалізується в епітеліальних пухлинах, забезпечуючи здатність до інвазії та метастазування, характеризується пошкодженням (дискомплексацією) екстрацелюлярного матриксу, втратою адгезії між клітинами і реорганізацією цитоскелету клітини [171].

При раку грудної залози зниження рівня E-кадгерину виявляється майже в 50% випадків інвазивної протокової карциноми, в той час як при інвазивній

часточковій карциномі – до 90%, насамперед у пухлинах з потрійним негативним фенотипом [170]. Деякі автори відзначають, що аберантна (тобто така, що має відхилення від норми) експресія E-кадгерину пов'язана зі стадією пухлинного процесу та розвитком метастазів, а також часто поєднується з відсутністю експресії ER [172]. Відомо, що втрата експресії E-кадгерину перешкоджає адгезії клітин пухлини грудної залози (епітеліального походження) з іншими епітеліальними клітинами, у той час як збільшення експресії N-кадгерину та потенційно інших мезенхімальних кадгеринів (кадгерин-11) сприяє адгезії пухлинних клітин зі стромальними елементами і сприяє наступній інвазії пухлинних клітин у строму.

P-кадгерин експресується в міоепітеліальних клітинах екзокринних залоз. При РГЗ його надлишкова продукція виявляється як при інвазивних протокових карциномах, так і при карциномах *in situ* [166, 173]. Аберантна експресія P-кадгерину при РГЗ пов'язана з дестабілізацією нормального комплексу кадгерин-катенін та цитоплазматичною експресією p120-катеніну [166, 174]. Юкстамембранний домен цитоплазматичного кінця P-кадгерину зв'язується з p120-катеніном та сприяє його накопиченню в цитоплазмі, стимулюючи активацію RhoGTPаз, Rac1 і Cdc42, забезпечуючи пухлинним клітинам підвищену мобільність і здатність до інвазії [173].

VE-кадгерин є головною молекулою клітинної адгезії, відповідальної за взаємозв'язок ендотеліальних клітин, і відіграє ключову роль у формуванні цілісності та проникності судин. Крім адгезивної функції VE-кадгерин може зв'язуватися з VEGFR2 (рецептором судинного ендотеліального фактора росту 2) у відповідь на стимуляцію VEGF, що є важливим механізмом, який бере участь як в інгібуванні клітинної проліферації, так і в підвищенні виживання клітин. При інвазивному РГЗ підвищена експресія VE-кадгерину виявляється як в ендотеліальних клітинах, так і в пухлинних епітеліальних клітинах, що призводить до адгезії між ними, проникнення пухлинних клітин у кровоплин та їх міграцію. Отримані дані дозволяють припустити, що VE-кадгерин має значення в метастазуванні при РГЗ на стадії інтравазації [161]. Аберантна

експресія VE-кадгерину призводить до подальшої активації сигнального шляху TGF- β , що стимулює клітинну проліферацію, і експресія VE-кадгерину збільшується в процесі епітеліально-мезенхімальної трансформації [166, 174, 175]. Експресія VE-кадгерину має значення не тільки при ангиогенезі, але також відіграє роль у стимуляції пухлинних клітин до пухлинної прогресії.

Таким чином, викладені дані вказують на важливу роль експресії кадгеринів, і зокрема, білка E-кадгерину. Встановлено, що знижена експресія E-кадгерину при розвитку пухлини запускає каскад сигнальних механізмів, забезпечуючи пухлинним клітинам інвазивніший фенотип, збільшуючи їх здатність до міграції, виживання та сприяючи розвитку віддалених метастазів. Важливим також є аналіз взаємозв'язку між експресією E-кадгерину, наявністю метастазів в лімфатичні вузли, клініко-патологічними ознаками та молекулярним фенотипом інвазивного протокового раку грудної залози. Оцінка експресії E-кадгерину є важливим прогностичним чинником перебігу різних фенотипів протокового раку грудної залози. І будь-які зміни, пов'язані з аномалією експресії чи дисфункцією молекул клітинної адгезії, можуть призвести до серйозних деструктивних наслідків.

Ангиогенез при інфільтративному протоковому раку грудної залози та його прогностичне і предиктивне значення.

Протягом тривалого часу значну увагу приділяють дослідженню судинного русла, так як ангиогенез є одним із ключових факторів пухлинної прогресії, пов'язаної з ростом і метастазуванням злоякісних новоутворень [176-178]. Сьогодні оцінка ангиогенезу вважається важливим маркером прогнозу захворювання та чутливості до протипухлинної терапії [179, 180]. Слід відзначити, що гіперстимуляція ангиогенезу проангіогенними чинниками, і, в першу чергу чинниками росту ендотелію судин, призводить до ремоделювання пухлинних судин, порушення їх морфології і функції [181, 182]. Зокрема, це хаотичне розташування судин в пухлині, наявність судин з незавершеною будовою, неможливість розрізнити різні типи дилатованих мікросудин, таких як артеріоли, капіляри і венули, наявність у просвітах

кровоносних і лімфатичних судин пухлинних клітин і пухлинних емболів, що є прогностично несприятливим чинником [183].

Різні морфологічні характеристики судин пухлини, найбільш ймовірно пов'язані з видом останньої. Це потрібно враховувати, так як судини, що мають різне походження, відрізняються чутливістю до інгібіторів ангиогенезу. Так, Qian CN. зі співавтор. виділяють такі типи утворення пухлинних судин [184], як брунькування нових судин за рахунок ендотеліальних паростків, що утворюються з існуючих материнських судин, шляхом їх проліферації [183, 185, 186], кооптація – кровопостачання пухлини за рахунок залучення судин, що знаходяться поблизу [187, 188]. Залучені до процесу судини, за даними авторів, є резистентними до терапії інгібіторами ангиогенезу [189, 190], пухлинна мімікрія, коли стінки судин частково або повністю вистелені пухлинними клітинами, або за рахунок вбудовування пухлинних клітин в ендотеліальну вистилку, або в результаті активної побудови пухлинними клітинами таких судин [191-195], васкулогенез – формування нових судин за участю ангиобластів або ендотеліальних прогеніторних клітин (попередників). Авторами зазначено, що визначення ангиобластів у пухлині або крові онкологічних пацієнтів може бути корисним для оцінки чутливості пухлини до терапії інгібіторами ангиогенезу [196-198] і хіміотерапії [199]. Багато авторів вважають, що оцінка ангиогенезу має велике значення для прогнозу захворювання та вибору методів протипухлинної терапії, у тому числі й при РГЗ [179, 180, 200-202].

Важливі дослідження ангиогенезу були проведені NR Smith зі співавт., в результаті чого ними було запропоновано два типи розподілу судин у пухлині: перший тип – пухлинний і другий тип – стромальний. Для першого типу характерним є дифузне розташування судин між пухлинними клітинами. Цей тип був асоційований із втратою E-кадгерину та експресією віментину, а також з інфільтрацією пухлини макрофагами. При другому типі судини розташовувалися переважно в пухлинній стромі, яка оточувала кластери

пухлинних клітин. Автори засвідчили, що найбільш чутливі до інгібіторів ангиогенезу пухлини, з вмістом 60% та більше судин першого типу [203].

Для оцінки активності пухлинного ангиогенезу використовують різноманітні маркери. Для цього вивчають рівень експресії фактора росту ендотелію судин ((VEGF) або його рецепторів (VEGFR-1, VEGFR 2, VEGFR-3) [204-206], а також щільність мікросудин пухлини, яку досліджують шляхом підрахунку кількості судин, що експресують CD31, CD34, CD133, D2-40, подопланін та інші маркери [179, 207]. Використання імуногістохімічних маркерів ендотеліальних клітин є найбільш широко застосовуваним дослідженням ангиогенезу, однак консенсус щодо того, який маркер ендотеліальних клітин забезпечує оптимальну чутливість і специфічність, не прийнятий і дані про дослідження, що порівнюють різні маркери при РГЗ, є суперечливими. Наприклад, фактор VIII був одним із перших використовуваних ендотеліальних маркерів [208]. Антитіло проти фактора VIII зазвичай призводить до адекватного забарвлення великих кровоносних судин, але в багатьох тканинах це антитіло часто не забарвлює капіляри та ендотеліальні клітини синусів [209], і реакція може виникнути також з ендотелієм лімфатичних судин [210]. Таким чином, достовірність цього методу для патологічних досліджень була поставлена під сумнів, що спонукало до пошуку більш чутливих маркерів. Що стосується експресії CD31, то вона проявляється у кровоносних судинах та інколи присутня у лімфатичних судинах. З антитіл, протестованих проти CD31, лише JC70 ідентифікований як такий, що є стійким до формаліну [208, 211, 212]. Маркування CD34 забарвлює кровоносні судини, як і CD31, без високого відсотка невдалого зафарбування [213]. Забарвлення CD34 відбувається у кровоносних судинах та слабо у лімфатичних судинах. Але необхідно наголосити, що при застосуванні маркера CD34 позитивними є і стромальні клітини, що зменшує його корисність для розрізнення лімфо-судинної інвазії від артефактів ретракції.

Судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF) - потужний індуктор судинної проникності, бере участь у фізіологічній неоваскуляризації в нормі і в пухлинах, особливо злоякісних, зокрема при РГЗ його високий рівень експресії асоціюється з агресивним перебігом захворювання [214, 215]. Крім того, експресія рецепторів VEGF-1 пухлинними клітинами грудної залози є несприятливим прогностичним чинником у зв'язку з підвищенням ризику появи метастазів та зниженням загальної і безрецидивної виживаності [216]. Гіперекспресія VEGF характерна переважно для Her2/neu позитивних пухлин грудної залози [217]. Пошук потенційних інгібіторів неоангіогенезу, зокрема VEGF як потенційної терапевтичної мішені, при різних видах раку, в тому числі при РГЗ було розпочато раніше і продовжується далі [218]. Для запобігання неоангіогенезу в пухлині використовувалася анти-VEGF терапія таргетним препаратом «бевацизумабом» [219]. Крім головного ефекту пригнічення росту нових судин, анти-VEGF терапія здатна посилювати апоптоз ендотеліальних клітин, зменшувати діаметр, щільність і проникність вже існуючих судин, посилювати апоптоз пухлинних клітин, впливати на відповідь імунної системи, робити пухлинну тканину більш доступною для хіміопроменевої терапії [220]. Але вже з 2010 року бевацизумаб у США в клінічній практиці не використовується через відсутність даних про покращення результатів загальної виживаності [221]. Важливо підкреслити, що при вивченні особливостей ангіогенезу необхідно враховувати чинники, які безпосередньо впливають на процеси ангіогенезу чи пов'язані з ними загальними механізмами. До таких факторів можна віднести запальну інфільтрацію стромы пухлини та ЕМТ пухлинних клітин. Ціла низка досліджень свідчить про те, що процеси ангіогенезу та ЕМТ тісно взаємопов'язані і можуть регулюватися одними і тими ж механізмами [222-225]. У роботі D Ribatti (2017) було зазначено, що при ЕМТ та ангіогенезі у клітинах спостерігаються схожі процеси: втрата полярності та маркерів клітинної адгезії, реорганізація цитоскелету з набуттям мезенхімальної морфології та здатності до міграції.

Висновки до Розділу 1

Інфільтративний протоковий РГЗ сьогодні визначається як гетерогенне захворювання з варіабельною морфологією, молекулярними особливостями, поведінкою та відповіддю на терапію. Окрім розробленої і запропонованої Perou SM (2000) молекулярно-генетичної класифікації РГЗ, в наш час проводяться дослідження, які дозволяють би точніше виділяти хворих як зі сприятливим, так і не сприятливим прогнозом перебігу захворювання, на основі прогностичних імуногістохімічних тестів профілів пухлин, ніж на основі стандартних клініко-морфологічних прогностичних факторів. Зі збільшенням можливостей лікування в епоху прецизійної медицини традиційні клініко-патологічні прогностичні змінні і встановлені молекулярні прогностичні маркери все-таки є недостатніми для відображення такого ступеня гетерогенності. Необхідний пошук додаткових молекулярних маркерів для персоналізованого підходу до терапії, а для вдосконалення лікування пацієнтів необхідні прогностичні біомаркери. У зв'язку з цим, чільне місце в прогнозуванні пухлин займає молекулярна морфопатологія, яка враховує наявність чи відсутність онкогенів і супресорів пухлинного росту (молекулярно-біологічних маркерів) у клітинах. Відмінності в експресії таких маркерів, як епітеліальний кадгерин (Е-кадгерин), що відіграє важливу роль у процесі клітинної адгезії, є потужним супресором інвазії та метастазування, циклооксигеназа-2 (СОХ-2) і її важлива роль у пухлинній трансформації, проліферації клітин і неоваскуляризації, розподіл інфільтруючих пухлину лімфоцитів, щільність та інтенсивність їх експресії, можуть пояснити, чому порівнювані за поширеністю і гістологічною структурою пухлини відрізняються за агресивністю перебігу захворювання.

Наявність інфільтруючих лімфоцитів в пухлині чи в перитуморальних ділянках було визнано важливим імунологічним біомаркером, який відображає протипухлинну імунну відповідь при РГЗ. Але прогностична цінність пухлино-інфільтруючих лімфоцитів при різних молекулярних підтипах інвазивного протокового РГЗ залишається недостатньо вивченою.

Важливим є також аналіз взаємозв'язку між експресією E-кадгерину, наявністю метастазів в лімфатичні вузли, клініко-патологічними ознаками та молекулярним фенотипом інвазивного протокового РГЗ. Оцінка експресії E-кадгерину є важливим прогностичним чинником перебігу раку грудної залози. І будь-які зміни, пов'язані з аномалією експресії чи дисфункцією молекул клітинної адгезії, можуть призвести до серйозних деструктивних наслідків.

Попередні дані вказують на важливу роль COX-2 у пухлинній трансформації, проліферації клітин і неоваскуляризації, тому оцінка експресії COX-2 є важливим прогностичним чинником перебігу різних молекулярних підтипів РГЗ, як і доцільність виділення COX-позитивних пухлин в окрему групу для оптимізації лікувальної тактики та використання можливостей таргетного контролю експресії ензиму. Це може бути важливим, особливо для гормональної терапії, оскільки COX-2 каталізує перетворення арахідонової кислоти в простагландини, які активують ароматазу, необхідну для синтезу естрогенів.

Використання імуногістохімічних маркерів ендотеліальних клітин є найбільш широко застосовуваним дослідженням ангіогенезу, однак консенсус того, який кореляційний взаємозв'язок існує між внутрішньопухлинними судинами і молекулярним підтипом інфільтративного протокового раку грудної залози, вплив неоваскуляризації на перебіг захворювання, на загальну та безрецидивну виживаність пацієнтів, є до кінця не встановлений, а дослідження, що порівнюють асоціації ангіогенезу і різних молекулярних фенотипів раку грудної залози, є суперечливими.

Отже, проведений аналіз джерел вітчизняної і зарубіжної літератури показав, що остаточно не вирішена низка важливих питань:

- не повністю проведені системні дослідження, присвячені комплексному вивченню особливостей гістологічної будови інфільтративного протокового раку грудної залози в залежності від молекулярного підтипу пухлини з оцінкою прогнозу перебігу захворювання;

- потребує подальшого вивчення біологічна активність структур інвазивного компонента пухлини за допомогою визначення імуногістохімічної експресії маркерів Ki-67 (проліферативної активності), E-кадгерину (клітинної адгезії), COX-2 (циклооксигенази-2), неоангіогенезу в залежності від молекулярного підтипу пухлини;

- залишається недостатньо вивченою прогностична цінність пухлино-інфільтруючих лімфоцитів при різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози;

- не з'ясовані і не проаналізовані парні і множинні кореляційні зв'язки між досліджуваними імуногістохімічними маркерами, молекулярними підтипами інвазивного протокового раку грудної залози та відомими прогностичними факторами (pT, pN та G);

- потребує встановлення прогностичних чинників перебігу захворювання на підставі комплексного патогістологічного, гістохімічного, імуногістохімічного, електронно-мікроскопічного та морфометричного дослідження для використання у практичній роботі патоморфолога й онколога.

Таким чином, інфільтративний протоковий РГЗ є актуальною медико-соціальною проблемою, враховуючи високу захворюваність і смертність серед жіночого населення у багатьох країнах світу. Встановлення взаємозв'язків між клінічними особливостями РГЗ, гетерогенністю будови інвазивного компонента і стромальної запальної реакції, показниками, що характеризують біологічні властивості пухлини при різних молекулярних підтипах, все це дасть змогу виділити прогностичні чинники, які допоможуть визначити несприятливий перебіг захворювання і стануть основою до персоніфікованого лікування з метою запобігання розвитку рецидивів і метастазів у хворих на інфільтративний протоковий РГЗ.

Результати дослідження, викладені у Розділі 1, опубліковані в наступних наукових працях:

1. Волос Л.І., Дудаш А.П. Молекулярний тип раку грудної залози як прогностичний фактор метастазування. Науковий журнал «Медичний форум», 2019; 17(17): 18-20.

2. Волос ЛІ, Дудаш АП. Молекулярна гетерогенність потрійно-негативного раку грудної залози як прогностичний чинник перебігу. Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.»; Львів, 22–23 травня 2020 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2020, с.17-21.

3. Волос ЛІ, Дудаш АП. Кі-67 як прогностичний маркер відповідно до молекулярного підтипу раку грудної залози. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки та практики»; м. Одеса, 15-16 травня 2020 р.- Одеса: ГО «Південна фундація медицини», 2020. с.41-47.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали дослідження

Основою наукової роботи стало комплексне клініко-морфологічне дослідження 193 випадків інфільтративного протокового РГЗ. Цільова вибірка для дослідження формувалася ретроспективно із загального варіаційного ряду хворих на інфільтративний протоковий РГЗ. Дослідження базувалося на відомостях з історій хвороби та амбулаторних карт диспансерного спостереження пацієнток, котрі проходили спеціалізоване протипухлинне лікування на базі Комунального некомерційного підприємства Львівської Обласної Ради «Львівський онкологічний регіональний лікувально-діагностичний центр» у 2017 році. Формування вибірки відбувалося відповідно до завдань наукового дослідження.

Основними показниками, які бралися до уваги і утворювали поріг включення, були характеристики онкологічного процесу, зокрема клінічно, рентгенологічно (мамографічно), ультрасонографічно, МРТ і морфологічно верифікований рак грудної залози без віддалених метастазів (M0), відсутність (N0) чи наявність регіонарної лімфаденопатії з морфологічно підтвердженим онкологічним походженням, що відповідає критеріям N1-2, виключення неoad'ювантного лікування. З урахуванням того, що досліджуваний матеріал набирался за 2017 рік, згідно з національними та міжнародними рекомендаціями використовувалася класифікація TNM сьомого видання. У дослідження були включені послідовні випадки вперше встановленого діагнозу інфільтративного протокового раку грудної залози, що відповідають вищезазначеним критеріям.

У теперішнє дослідження не включались хворі з морфологічною картиною пухлини неепітеліального походження або неінвазивного (внутрішньопотокового раку *in situ*) чи інвазивного часточкового раку

грудної залози, з рецидивом пухлинного процесу і віком до 18 років, без гістологічної верифікації інфільтративного протокового раку грудної залози,

Після ретельного аналізу анамнезу захворювання і клінічного портрету пацієнток з проекту дослідження були виключені профайли хворих, яким проводилася передопераційна хіміопроменева чи гормонотерапія та попередні хірургічні втручання. Дані про 193 хворих на інфільтративний протоковий рак грудної залози містяться в архівах Львівського онкологічного регіонального лікувально-діагностичного центру.

Дослідження було схвалене Комісією з біоетики Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, затверджене протоколами №1 від 20.01.2020 р. і №7 від 26.06.2023 р засідань і проведене з дотриманням основних біоетичних положень Конвенції Ради Європи про права людини та біомедицину (від 04.04.1997 р), Гельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини (1964-2008 рр.), і також наказу МОЗ України № 690 від 23.09.2009 р.

Після проведення стандартизації за цільовими віковими, клінічними та гістологічними параметрами загальна вибірка із 193 хворих була класифікована на основі статусу експресії ER / PR / HER-2/neu та Ki-67 на чотири молекулярні підтипи відповідно консенсусних визначень молекулярних підтипів St. Gallen і сформовані наступні когорти: люмінальний А підтип; люмінальний В підтип; Her-2/neu; потрійно-негативний.

Визначення (сурогатне) молекулярно-біологічного підтипу РГЗ проводилося ІГХ методом відповідно рекомендацій експертів St. Gallen, 2019.

1. Люмінальний А:

- ER та / або PR позитивний та HER-2/neu негативний, Ki-67 < 20%)

2. Люмінальний В:

- ER та / або PR позитивний, HER-2/neu негативний, Ki-67 \geq 20%

- ER та / або PR позитивний та HER-2/neu позитивний, Ki-67 будь-який.
3. HER-2/ neu позитивний (ER і PR негативний, але HER-2/neu позитивний)
 4. Потрійний негативний (ER, PR та HER-2/neu негативний).

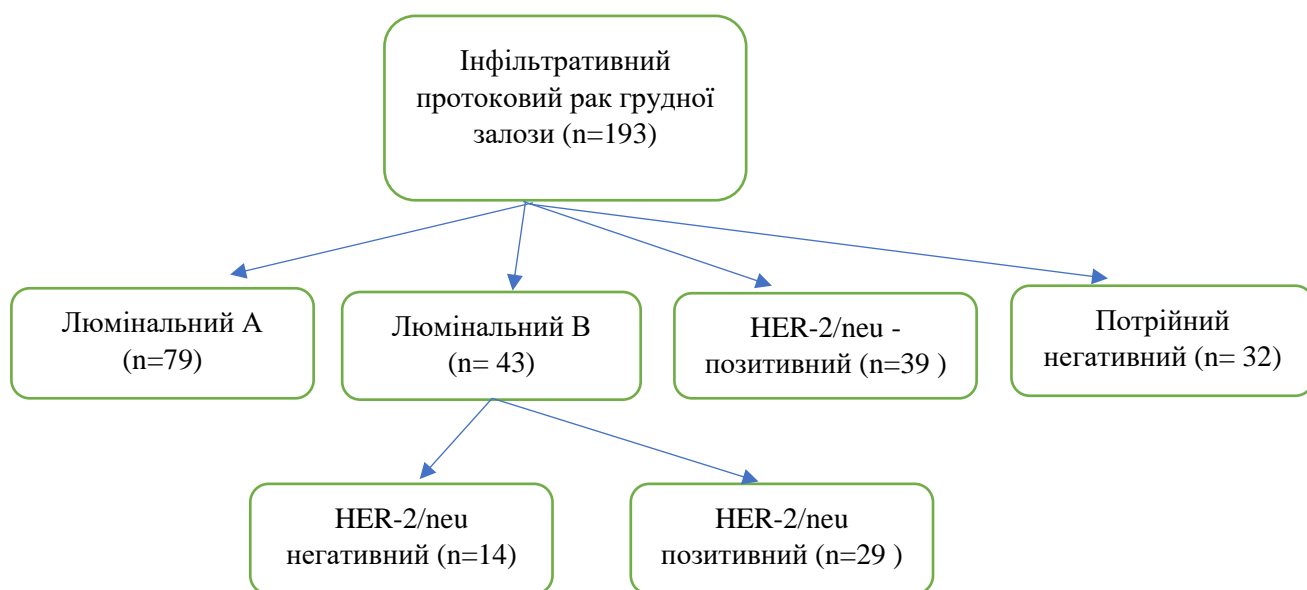


Рис.2.1 Матеріали дослідження.

Дисертаційна робота виконана у Львівському національному медичному університеті імені Данила Галицького на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини (Завідувач кафедри – професор Поспішіль Ю.О.), у Західноукраїнській гістологічній лабораторії, Львів (Директор – Гулей Р.В.). Клінічною базою слугувало Комунальне некомерційне підприємство Львівської Обласної Ради «Львівський онкологічний регіональний лікувально-діагностичний центр» (Генеральний директор – Ковальчук І.В.).

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Морфологічні методи дослідження

Виконувалось морфологічне дослідження операційного матеріалу. Всім пацієнткам були виконані радикальні операції: радикальна мастектомія за Мадденом в більшості випадків і радикальна резекція грудної залози. Клінічні і патологічні дані, включаючи вік пацієнток, розмір пухлини і локалізацію, стадію хвороби, статус регіонарних лімфатичних вузлів отримували з амбулаторних карт та історій хвороби пацієнток.

Зразки тканини первинної пухлини після загального дослідження фіксували в 10% нейтральному забуференому розчині формаліну, з наступним зневодненням у спиртах зростаючої концентрації і заливкою в парафін за стандартною методикою. З парафінових блоків зі зразками пухлинної тканини на ротаційному мікротомі Leica RM2235 виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 ± 1 мкм, які наносили на предметні скельця з адгезивним покриттям. Депарафінові гістологічні зрізи забарвлювалися гематоксиліном та еозином за стандартною методикою.

Стандартні препарати, забарвлені гематоксиліном та еозином, досліджували під мікроскопом для уточнення чи встановлення наступних даних: тип пухлини, ступінь диференціювання, наявність вторинних змін, таких як некроз, склероз, запалення, крововиливи, мікрокальцифікати, наявність перитуморальної лімфатичної, васкулярної та периневральної інвазії, стан лімфатичних вузлів, характеристика паренхіматозного і стромального компонентів, співвідношення паренхіматозного і стромального компонентів.

Для дослідження морфологічних та імуногістохімічних особливостей тканини первинної пухлини було вивчено рецепторний статус новоутворення, дана оцінка HER-2/neu статусу новоутворення, проліферативної активності Ki-67; крім того, досліджено біологічні властивості пухлинних клітин, такі як міжклітинна адгезія в пухлині, патологічна індукована експресія COX-2,

експресія CD31 як показник неоангіогенезу пухлини, виразність запальної інфільтрації стромі.

Пухлини були діагностовані відповідно класифікації пухлин грудної залози ВООЗ (Breast Tumours, WHO Classification of Tumours, 5th Edition, Volume 2, 2019). У дослідження увійшли тільки випадки з інфільтративною протоковою карциномою грудної залози.

Ступінь злоякісності (G) оцінювався за системою P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson у модифікації Elston-Ellis (Ноттингемська класифікація) [226]. Ступінь злоякісності є оцінкою рівня диференціювання тканини (виразність тубулярних структур і ядерний поліморфізм) і проліферативної активності (мітотичний індекс), що суб'єктивно відображають ступінь агресії пухлини. Ступінь диференціювання пухлини багато в чому визначає перебіг пухлинного процесу: високодиференційовані пухлини характеризуються меншою проліферативною і метастатичною активністю, в той час як низькодиференційовані мають більш агресивний потенціал і вимагають активної терапії.

У даний час у всіх злоякісних інвазивних пухлинах грудної залози ступінь злоякісності визначається за трьома критеріями: формуванням залозистих/тубулярних структур, виразністю ядерного поліморфізму і числом мітозів.

Оцінка залозистих/тубулярних структур у балах проводилася у всіх зразках матеріалу:

- 1 бал – більше 75% пухлинного поля формують залозисті/тубулярні структури;
- 2 бали — від 10% до 75% пухлинного зразка;
- 3 бали – менше 10% пухлинного зразка.

Ядерний поліморфізм є морфологічним проявом пухлинного диференціювання на клітинному рівні; це візуальний патерн генетичних поломок у пухлинній клітині: анеуплоїдії, генетичної нестабільності та зміни транскрипції. Ядерний поліморфізм оцінюється за бальною системою:

- 1 бал — ядра маленькі, дещо збільшені порівняно з ядрами епітелію нормальних структур, з правильними контурами, моноформним ядерним хроматином, несуттєвою різницею в розмірах;

- 2 бали – клітини більші, ніж нормальні епітеліоцити, з везикулярними ядрами, виразнішими ядерцями, помірними відмінностями у розмірах та формі;

- 3 бали - везикулярні ядра, часто з помітними ядерцями, значні відмінності за формою та розміром, найчастіше з химерними формами, виразний поліморфізм.

Пухлинна гетерогенність проявляється і в проліферативній активності. Для максимально точної оцінки підрахунок проводять у 10 полях зору при великому збільшенні мікроскопа по периферії пухлинного вузла, де очікується найбільше проліферуючих клітин. Важливим аспектом є характеристики мікроскопа, що використовується. Кількість мітозів залежить від площі поля зору. Мітотична активність при діаметрі поля зору 0,50 мм становить:

- ≤ 7 – 1 бал;
- 8–14 – 2 бали;
- ≥ 15 – 3 бали.

За сумою балів кожного критерію визначається ступінь злоякісності:

- Перший ступінь (G1) – 3–5 балів (високодиференційований рак);
- Другий ступінь (G2) – 6–7 балів (помірnodиференційований рак);
- Третій ступінь (G3) – 8–9 балів (низькодиференційований рак).

Усі препарати були оцінені самостійно і паралельно незалежними патологоанатомами для забезпечення достовірності.

Візуалізацію і мікрофотографування виконували за допомогою світлооптичного мікроскопу Leica DM 2500 (Leica Microsystems GmbH, Німеччина) з цифровою камерою Leica DFC450 C (Німеччина) та програмним забезпеченням Leica Application Suit Version 3.8.

2.2.2 Імуногістохімічні методи дослідження

ІГХ дослідження проводили на зрізах із парафінових блоків, призначених для стандартного морфологічного дослідження. У роботі використовувалися первинні моноклональні антитіла. Панель даних антитіл представлена таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Панель антитіл для ІГХ дослідження

Антитіло	Клон	Фірма	Імунізова на тварина	Розведення	Буфер для демаскування антигенів	Локалізація в клітині
Estrogen Receptor, ER	SP1	Thermo Fisher scientific	кролячі антитіла, моноклон	1:250	10mM citrate buffer, pH 6.0	Ядро
Progesteron Receptor, PR	Clone 16	Master diagnostica	мишачі антитіла, моноклон	Ready to use	10mM citrate buffer, pH 6.0	Ядро
HER2/neu c-erbB2	SP3	Thermo scientific	кролячі антитіла, моноклон	1:250	10mM citrate buffer, pH 6.0	Плазматична мембрана
Ki-67	MIB-1	Dako, Flex	мишачі антитіла, моноклон	Ready to use	10mM citrate buffer, pH 6.0	Ядро
E-cadherin	HEC D-1	Master diagnostica	мишачі антитіла, моноклон	Ready to use	10mM citrate buffer, pH 6.0	Плазматична мембрана

продовження таблиці 2.1

COX-2	SP21	Thermo Fisher scientific	кролячі антитіла, моноклон	1:10	10mM citrate buffer, pH 6.0	Цитоплазма
CD31	JC70A	Thermo Fisher scientific	мишачі антитіла, моноклон	1:50	10mM citrate buffer, pH 6.0	Ендотеліальні клітини, мембрана
CD3	SP7	Thermo Fisher scientific	кролячі антитіла, моноклон	1:150	10mM citrate buffer, pH 6.0	Плазматична мембрана
CD20	Ab-1	Thermo Fisher scientific	мишачі антитіла, моноклон	1:250	10mM citrate buffer, pH 6.0	Плазматична мембрана
CD56	123C3	Master Diagnostica	мишачі антитіла, моноклон	Ready to use	10mM citrate buffer, pH 6.0	Плазматична мембрана

Імуногістохімічні дослідження проводились у Західноукраїнській гістологічній лабораторії (м. Львів). Гістологічні зрізи інфільтративного протокового РГЗ товщиною 5 ± 1 мкм наносили на високоадгезивні предметні скельця, висушували, депарафінували і проводили регідrataцію відповідно прийнятих стандартів, після чого виконувалася процедура демаскування – виявлення більшості антигенів після фіксації в 10% нейтральному забуференому формаліні. Демаскування проводили за допомогою водяної бані при 95°C із застосуванням буферного розчину (буфер для демаскування Citrate Buffer, pH 6.0).

Інкубацію з первинними антитілами проводили згідно інструкцій фірм-виробників, візуалізацію ІГХ-реакції виконували з використанням системи детекції DAKO EnVision+System з хромогеном діамінобензидином («ДАКО»,

США). Оцінюючи препарат, необхідно орієнтуватися у зрізі, тому наступним етапом було дозобарвлення зрізів гематоксиліном Майєра і заключення препаратів у канадський бальзам.

ІГХ дослідження для рецепторів естрогенів ER (моноклональні кролячі антитіла, Clone SP1, Dako), рецептора прогестерону PR (моноклональні мишачі антитіла PgR 636, Dako Flex), c-erbB2 (моноклональні кролячі антитіла до Her2-neu, Clone SP3, Thermo scientific), білка Ki-67 (моноклональні мишачі антитіла, clone MIB-1, Dako), для CD3 (моноклональні кролячі антитіла, Clone SP7, Thermo scientific), CD20 (моноклональні мишачі антитіла, Clone L26, Thermo scientific), CD56 (моноклональні мишачі антитіла, Clone 123C3 Thermo scientific), для COX-2 (моноклональні кролячі антитіла, Clone SP21, Thermo scientific), E-кадгерину (моноклональні мишачі антитіла, Clone HECD-1, Master diagnostica) проводили відповідно до протоколу виробника з необхідними контролюями.

Оцінка імуногістохімічного забарвлення ER, PR, Her-2/neu і Ki-67. Позитивна експресія ER і PR була встановлена, коли $\geq 1\%$ неопластичних клітин проявили позитивну ядерну експресію будь-якої інтенсивності [227]. Оцінку статусу ER та PR проводили згідно з рекомендаціями Американського товариства клінічної онкології/Коледжу американських патологів (ASCO/CAP) щодо тестування ER та PR ІГХ. Експертна група продовжує рекомендувати ER-тестування інвазивного РГЗ за допомогою перевіреної імуногістохімії. Зразки РГЗ з 1% до 100% позитивних пухлинних ядер слід інтерпретувати як ER-позитивні. Що стосується рівня проліферативної активності, то поріг між низькою і високою ядерною експресією Ki-67 був встановлений на рівні $\geq 20\%$ позитивних клітин згідно Консенсусу St. Gallen 2015. Для Her-2/neu ІГХ розглядається лише мембранне забарвлення, а більше 10% сильної мембранної позитивності було прийнято як позитивне (3+) Her-2/neu відповідно до рекомендацій Коледжу американських патологів (CAP).

Оцінка імуногістохімічного забарвлення CD3, CD20 і CD56. Предметні скельця з гістологічними зрізами, типованими на Т-лімфоцити (CD3), В-

лімфоцити (CD20) і NK-клітини (натуральні кілери, CD56), досліджували в оптичному мікроскопі Leica DM 2500 при малому збільшенні ($\times 25$), щоб вибрати ділянки з найбільшим позитивним клітинним інфільтратом. У дослідницьких цілях до аналізу застосовувалися три системи оцінки:

1. Щільність досліджених CD3- і CD20-позитивних клітин (Т- і В-клітин відповідно) оцінювали при збільшенні ($\times 200$) як відсоток позитивно забарвлених клітин інфільтрату до загальної кількості в полі зору. Клітини, розташовані не далі за одного 100-кратного поля від краю пухлини, вважалися «інвазивним краєм». Внутрішньопухлинну популяцію визначали як позитивно забарвлені клітини, розташовані всередині острівців пухлинних клітин або оточуючі пухлинні острівці, з прямим контактом з неопластичною тканиною. Щільність клітин оцінювали як середнє значення (%), отримане в 5 полях потужності найвищого лімфоїдного інфільтрату.

2. Інтенсивність інфільтрату CD3- і CD20-позитивних клітин додатково оцінювали відповідно до візуально-аналогової шкали. Позитивною реакцією вважали забарвлення клітин коричневого кольору з різною інтенсивністю. Оцінка була наступною: 0 - немає, 1 - слабка, 2 - помірна, 3 - інтенсивний лімфоїдний інфільтрат. Ступінь інтенсивності також визначали у відсотках до позитивно забарвлених клітин інфільтрату.

3. Для оцінки CD56-позитивних (NK) клітин позитивно забарвлені клітини досліджували при збільшенні ($\times 200$) і вибирали ділянки з найбільшою кількістю позитивних клітин. Потім позитивно забарвлені клітини підраховували в п'яти полях з високим збільшенням ($\times 400$, площа поля займає $0,2 \text{ мм}^2$), які представляли 1 мм^2 досліджуваної тканини. Клітини, розташовані не далі одного поля від краю пухлини, вважалися «інвазивним краєм». Внутрішньопухлинно популяцію визначали як позитивно забарвлені клітини, розташовані всередині острівців пухлинних клітин, або позитивно забарвлені клітини, що оточують пухлинні острівці, з прямим контактом з неопластичною тканиною.

Крім того, наявність, локалізацію та інтенсивність експресії ключових діагностичних, прогностичних та прогнозних біомаркерів CD3, CD20 і CD56 - позитивних клітин (Т-, В- і NK клітин відповідно) у зрізах тканини інвазивного протокового РГЗ, виявлених за допомогою антитіл і систем детекції на основі хромогенних речовин, визначали за допомогою відкритої, потужної програмної платформи QuPath для аналізу біозображень. Вбудовані алгоритми сегментації клітин QuPath можуть виявляти потенційно велику кількість клітин як об'єкти в межах одного поля зору, на додаток до вимірювання клітинної морфології та експресії біомаркерів. QuPath також підтримує класифікацію різних типів клітин відповідно до цих ознак, щоб створити комплексний фенотиповий опис кожної клітини у зразку тканини. Це, у свою чергу, забезпечує кількісну клітинну карту всього зрізу тканини, яку згодом можна вибрати, відфільтрувати, щоб отримати дані зображення та виявити морфологічні ознаки, які не відразу помітні під час традиційної патогістологічної оцінки. Все це, як правило, можна досягти за лічені хвилини, не вимагаючи спеціального обладнання.

Оцінка імуногістохімічного забарвлення COX-2. Експресію COX-2 оцінювали напівкількісно за допомогою системи підрахунку *Histoscore*. Ґрунтуючись на опублікованих даних щодо можливих граничних меж, у даному дослідженні використовували просту систему оцінки, яка була ідентичною системі оцінки, що використовувалася для оцінки статусу гормональних рецепторів у пацієнтів з карциномою грудної залози, і в якій експресію COX-2 оцінювали відповідно до відсотка позитивних клітин та інтенсивності забарвлення. Відсоток позитивних клітин оцінювався як 0 (0% позитивних клітин), 1 (до 10% позитивних клітин), 2 (11–50% позитивних клітин), 3 (51–80% позитивних клітин) або 4 (більше 81%). Інтенсивність фарбування оцінювалася за ступенями: 0 (негативний, без забарвлення, «-»), 1 (слабкий ступінь, «+»), 2 (помірний ступінь, «++») або 3 (сильний ступінь, «+++»). Імунореактивний показник визначали як добуток позитивних клітин та інтенсивності забарвлення, в результаті чого отримували значення від 0

(мінімум) до 12 (максимум) умовних одиниць (у.о.). Розподіл пухлин зі слабкою експресією COX-2 або сильною експресією COX-2 визначався на рівні граничного показника 6, тобто експресія COX-2 у пухлинах від 0 до 6 у.о. означала негативну, слабку чи помірну, а 7-12 у.о. – надекспресію COX-2. Усі препарати були оцінені самостійно і паралельно незалежними патологоанатомами для забезпечення узгодженості.

Оцінка імуногістохімічного забарвлення E-кадгерину. Реакцію E-кадгерину оцінювали за допомогою системи підрахунку, розробленої Qureshi та співавт. [228], в якій експресію E-кадгерину оцінювали відповідно до відсотка позитивних клітин та інтенсивності забарвлення у п'яти полях зору зі збільшенням $\times 400$. Оцінювання: 0 – відсутність забарвлення або позитивність мембрани в $<10\%$ пухлинних клітин; 1 – неповне і слабе мембранне забарвлення $>10\%$ пухлинних клітин; 2 – повне мембранне забарвлення зі слабкою або помірною інтенсивністю у $>10\%$ пухлинних клітин; 3 – сильне забарвлення мембрани в $>10\%$ пухлинних клітин. Відповідно до цієї оцінки реакція вважалася негативною для балів 0 і 1, слабо позитивною для балів 2 і сильно позитивною для балів 3. Забарвлення цитоплазми вважалася неспецифічним і не включалося в оцінку. Наявність забарвлення E-кадгерином в епітеліальних клітинах нормальних проток і ацинусів слугувало внутрішнім позитивним контролем. Усі препарати були також оцінені самостійно і паралельно незалежними патологоанатомами для забезпечення узгодженості. У спірних випадках рішення ухвалювалося колегіально.

Оцінка імуногістохімічного забарвлення CD31. Експресію CD31 оцінювали шляхом позитивного забарвлення ендотелію судин, використовуючи антитіло до CD31 (JC70A, Thermo science), що є стійким до формаліну. У стромі пухлини при малому збільшенні ($\times 100$) визначали перитата інтратуморальні ділянки. Судини, розташовані в пухлинній тканині, розцінювали як внутрішньопухлинні. Судини, розташовані зовні пухлини, але не далі 2 мм від краю – як перитуморальні. У гістологічних препаратах, забарвлених антитілами до CD31, також оцінювали ділянки з вираженою

васкуляризацією, наявність розширених і атипово розширених капілярів у внутрішньопухлинній і перитуморальній стромі, наявність структур з частково ендотеліальною вистилкою. Кількість розширених і атипових розширених капілярів, а також структур з частково ендотеліальною вистилкою оцінювали шляхом напівкількісного підрахунку при збільшенні $\times 200$ (відсутні; поодинокі – не більше двох у полі зору; множинні – більше двох у полі зору) за Bosari S. Зі співавтор. [229].

2.2.3. Скануюча електронна мікроскопія

Окрім світлової, нами використана скануюча електронна мікроскопія (SEM), яка є методом дослідження поверхні зразків, а також інших дрібних об'єктів. Глибина різкості при цьому є значною, що дає можливість отримати об'ємне різке зображення. SEM зразків тканин РГЗ є технічно складною у порівнянні з трансмісійною електронною мікроскопією, оскільки оточуюча колагеново-волокниста строма може затемнювати епітеліальні структури, що і визначає важкість проведення досліджень та аналіз поверхневої конфігурації пухлини. Проте застосування скануючої електронної мікроскопії в дослідженні протокового РГЗ різного ступеня диференціювання і різної гістологічної будови інвазивного компонента в порівняльному аспекті може мати прогностично важливе значення для оцінки перебігу захворювання.

Зразки тканини 12 випадків інвазивної протокової карциноми фіксували в 2% розчині глютаральдегіду протягом 2 годин, потім промивали тричі дистильованою водою по 10 хвилин кожен раз. Чисті промиті зразки заморожували і поміщали в сублімаційну установку, де протягом двох годин проводилася дегідратація тканин без втрати об'єму і форми. Висушені зразки наклеювали на предметні столики для подальшого напилення провідною плівкою у вакуумному напилювачі, оскільки поверхня зразка повинна бути електропровідною. Електронно-мікроскопічні дослідження проводилась на скануючому електронному мікроскопі JEOL T220A на базі лабораторії фізичних методів дослідження в геології ЛНУ ім. І. Франка. Поверхню зразків

напилювали тонким шаром срібла у вакуумному напилювачі ВУП-5. Для фотографування поверхні зразків використовувалось збільшення $\times 35$ до $\times 4000$, а прискорююча напруга в усіх дослідженнях була рівною 25 кВ.

2.2.4 Статистичні методи дослідження

У роботі використано методи описової та аналітичної статистики. При статистичній обробці результатів морфологічних та імуногістохімічних досліджень перевірка гіпотези про нормальність розподілу проводилася за допомогою критерію Шапіро-Вілка. Дані, що підпорядковуються нормальному закону розподілу, представлені середнім значенням і стандартним відхиленням ($M \pm SD$). Такі середні значення порівнювалися за t -критерієм Стьюдента. Дані, які не підкорялися нормальному закону розподілу, представлені медіаною та квартильним розмахом ($Me [25\%; 75\%]$, де Me – медіана, 25% – перший квартиль, 75% – третій квартиль. Суттєвість різниці між ними визначали за критерієм Манна-Уїтні (U). Отримані відсоткові показники представлено у вигляді часток та 95% довірчих інтервалів (% [95%ДІ]). Довірчі інтервали вираховували за критерієм- ϕ кутового перетворення Фішера. Достовірність різниці визначали методом точного критерію Фішера, при мінімальному рівні значимості $p < 0,05$.

Для оцінки зв'язків між клініко-патологічними ознаками, імуногістохімічними маркерами використовували непараметричний аналіз з обчисленням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена (R). Значення коефіцієнта R від 0,1 до 0,29 свідчило про слабкий зв'язок ознак; значення від 0,30 до 0,69 підтверджувало середній ступінь зв'язку ознак; значення від 0,70 і вище свідчило про наявність сильного зв'язку між ознаками, що вивчалися.

Для всіх видів аналізу відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$.

При визначенні залежності показників від діючих факторів використовувався мультифакторний регресійний аналіз, який проводився методом лінійної регресії. Включення показників у модель прогнозування відбувалось за допомогою методу покрокового відбору, що дозволило

відібрати значимі найоптимальніші моделі для кожної групи пацієнтів. Достовірність отриманих показників підтверджувалась критерієм Фішера (F). За використанням критерію автокореляції Дурбіна-Уотсона доводили правильність побудованої моделі. Для оцінки адекватності моделей прогнозування використано метод побудови та аналізу кривих операційних характеристик моделей (ROC-кривих), оцінку якостей прогнозування проводили за площею під кривою операційних характеристик (AUC) та показниками чутливості, специфічності, прогностичності позитивного та негативного результатів, розраховані відповідні 95 % ДІ показників.

Обробка даних проводилася прикладними статистичними методами, які використовуються в медицині, за допомогою програми R Commander (version 2.7-2, GNU General Public License) на базі операційної системи Windows.

РОЗДІЛ 3

МОЛЕКУЛЯРНІ ПІДТИПИ ІНФІЛЬТРАТИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ ТА ЇХ КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ

3.1 Молекулярні підтипи та їх характеристика

Цільова вибірка із 193 пацієнток формувалася ретроспективно із загального варіаційного ряду хворих на інфільтративний протоковий РГЗ з клініко-морфологічною характеристикою $T_{1-4}N_{0-2}M_0$ за міжнародною класифікацією TNM.

Дані про 193 випадки інфільтративного протокового РГЗ, що відповідали вимогам відбору до дослідження за клініко-морфологічними характеристиками хвороби та видом протипухлинного лікування містяться в архівах «Львівського онкологічного регіонального лікувально-діагностичного центру» за 2017 р. Формування вибірки відбувалося відповідно до завдань наукового дослідження.

Характеристика пацієнток загальної вибірки.

У всіх пацієнток на момент встановлення діагнозу реєстрували вік, менструальну функцію, визначали розмір, ступінь диференціації пухлини, а також наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах.

Віковий діапазон склав [27-85] років з середнім значенням $M \pm m$ (54,73±10,5). Для інтервального групування обрані рівні десятирічні періоди. Гендерний склад вибірки представлений тільки жінками і склав 193 (100%) пацієнтки. Абсолютна більшість хворих – 110 (57%) припала на груповий інтервал пацієнток працездатного віку [30-59] років. Віковий склад пацієнток загальної вибірки представлено в таблиці 3.1.

Таблиця 3.1

Віковий склад хворих загальної вибірки

Вік пацієнок, роки	Загальна вибірка n=193 (100%)
20-29	0 (0%)
30-39	15 (7,77%)
40-49	35 (18,14%)
50-59	60 (31,09%)
60-69	49 (25,39%)
70-79	31 (16,06%)
>80	3 (1,55%)

Під час дослідження клініко-морфологічних характеристик пухлини виконано групування за макро- і мікроскопічними особливостями. За даними історій хвороби первинний осередок пухлини переважав у лівій грудній залозі пацієнок, відповідно діагностований у 102 (52,85%) хворих, в той час у правій грудній залозі виявлений у 91 (47,15%) пацієнтки. Відносно квадрантної схеми грудної залози, пухлини розташовувались переважно у зовнішніх верхніх і зовнішніх нижніх квадрантах. За клініко-інструментальною оцінкою пухлини, напрямком і характером інвазії, пацієнтки згруповані відповідно загальноприйнятій міжнародній класифікації TNM. Розподіл пацієнок загальної вибірки відповідно класифікації TNM представлено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2

Розподіл пацієнок загальної вибірки відповідно класифікації TNM

Стадія T	Загальна вибірка n=193 (100%)
T1	61 (31,61%)
T2	96 (49,74%)
T3	19 (9,84%)
T4	17 (8,81%)

При цьому найбільшу питому вагу склали пацієнтки зі стадією T1 і T2, тобто розміри пухлини у пацієнток були при T1 (≤ 2 см), T2 (> 2 см, < 5 см). У понад 50,0% хворих на час встановлення діагнозу реєстрували збільшення лімфатичних вузлів, тобто метастатичний процес поширювався в регіонарних і віддалених лімфатичних вузлах (N1-2).

Визначення ступеня злоякісності (Grade) і розподіл був наступним: G1 відзначено у 16 (8,29%) хворих, G2 – у 129 (66,84%) хворих, G3 – у 47 (24,35%) і G4 – в 1 (0,52%) хворої.

Після проведення стандартизації за цільовими віковими, клінічними та гістологічними параметрами загальна вибірка із 193 хворих була розподілена на основі статусу експресії ER / PR / HER2 / neu та Ki-67 на чотири молекулярні підтипи відповідно консенсусних визначень молекулярних підтипів St. Gallen і сформовані наступні когорти: люмінальний А підтип; люмінальний В підтип; Her-2/neu позитивний; потрійний негативний (табл.3.3). Визначення молекулярно-біологічного підтипу РГЗ проводилося ІГХ методом (сурогатним або замінним) відповідно рекомендацій експертів St. Gallen, 2015, 2017.

Таблиця 3.3

Розподіл пацієнток загальної вибірки відповідно до імуногістохімічної характеристики операційного матеріалу пухлини і молекулярного підтипу

Молекулярний підтип інфільтративного протокового раку грудної залози	Загальна вибірка n=193 (100%)
Люмінальний А: ER+, PR+/-, HER-2/neu-, Ki-67 < 20%	79 (40,93%)
Люмінальний В:	43 (22,28%):
• ER+, PR+/-, HER-2/neu-, Ki67 \geq 20%	14 (32,56%)
• ER+, PR+/-, HER-2/neu+, Ki67 – будь-яке.	29 (67,44%)
Her-2/neu позитивний: ER-, PR-, HER-2/neu+	39 (20,21%)
Потрійний негативний: ER-, PR-, HER-2/neu-	32 (16,58%)

Розподіл пацієток за віком на момент встановлення діагнозу інфільтративного протокового раку грудної залози і відповідним підтипом пухлини представлено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4

Розподіл пацієток за віком на момент встановлення діагнозу інфільтративного протокового раку грудної залози і відповідним підтипом пухлини

Вік пацієток, роки	Люмінальний А n=79	Люмінальний В n=43	Her-2/neu+ n=39	Потрійний негативний n=32
20-29	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
30-39	3 (3,80%)	5 (11,63%): 1 – Ki67>20%	6 (15,38%)	1 (3,13%)
40-49	15 (18,98%)	9 (20,93%): 3 – Ki67>20%	6 (15,38%)	5 (15,63%)
50-59	16 (20,25%)	16 (37,21%): 6 – Ki67>20%	16 (41,03%)	12 (37,5%)
60-69	25 (31,65%)	9 (20,93%): 2 - Ki67>20%	8 (20,52%)	7 (21,87%)
70-79	17 (21,52%)	4 (9,30%): 2 – Ki67>20%	3 (7,69%)	7 (21,87%)
>80	3 (3,80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Відповідно до висновку ІГХ оцінки, найбільший відсоток із загальної вибірки мали зразки з рецепторним профілем люмінального А раку грудної залози (40,93%). Середній вік хворих з люмінальним підтипом А становив $60,41 \pm 12,25$ років (діапазон 32–85 років), причому тільки 26 (32,9%) пацієток були у віці до 55 років, а дві третини хворих були старшого і похилого віку. Другу клінічну стадію діагностовано у 35 (44,3%) хворих і III – у 31 (39,24%)

пацієнтки. Менопаузальний статус зареєстрований у 67,1% випадків. За ступенем диференціації пухлини розподілилися наступним чином: G1 – 10 (12,66%), G2 – 56 (70,88%), G3 – 13 (16,46%) випадків. У 42 (53%) випадках пухлини локалізувалися у лівій і в 37 (47%) – у правій грудній залозі. Всі пацієнтки отримували комбіноване лікування у вигляді оперативного втручання в обсязі радикальної мастектомії або радикальної резекції та гормонотерапії (інгібітори ароматази або тамоксифен). За результатами морфологічного дослідження операційного матеріалу метастази в пахвові лімфовузли діагностовано у 39 (49,37%) пацієнток.

Щодо розподілу за віком, потрібно звернути увагу, що більшість хворих – 25 (31,65%) припала на віковий інтервал 60-69 років і 17 (21,52%) пацієнток – на 70-79 років. Імуногістохімічна оцінка з рецепторним профілем люмінального А підтипу інфільтративного протокового раку грудної залози представлена на рис.3.1.

При високій мітотичній активності клітин (Ki67 >20%), згідно з рекомендаціями конгресу St. Gallen щодо лікування РГЗ, пухлини з люмінальним А підтипом віднесені до люмінального В Her-2/neu-негативного молекулярного підтипу (ER+, PR+/-, HER-2/neu-, Ki67 \geq 20%). Необхідність виділення люмінального В Her-2/neu-негативного типу РГЗ продиктована особливостями цих пухлин, які більше подібні до люмінальних В, ніж до люмінальних А пухлин. Тому пацієнткам з високою мітотичною активністю пухлини, яка визначає несприятливий прогноз перебігу захворювання, перед призначенням антигормональної терапії показано проведення ад'ювантної поліхіміотерапії.

Люмінальний В підтип у нашій вибірці був менш поширеним в порівнянні з Люмінальним А підтипом.

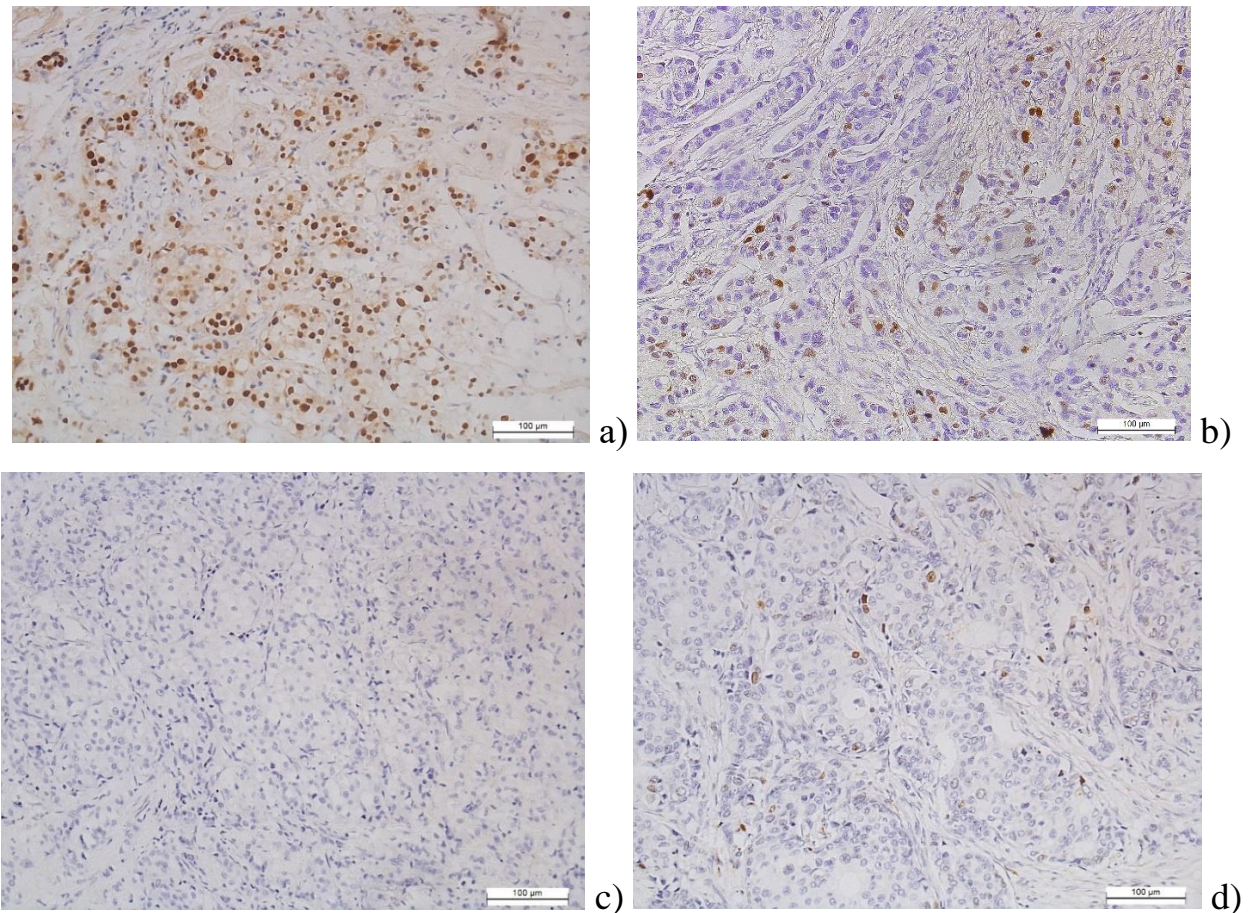


Рисунок 3.1 Інвазивна протокова карцинома грудної залози. Люмінальний А підтип. ІГХ дослідження: а) – позитивна ядерна експресія ER (Clone SP1, Thermo science); б) – позитивна ядерна експресія PR (Clone 16, Master diagnostic); в) – негативна мембранна експресія рецепторів для c-erbB-2 (негативний статус HER-2 / neu, Clone SP3, Thermo science); д) - позитивна ядерна експресія Ki-67 < 20% в тканині інвазивної протокової карциноми (Clone MIB-1, Dako, Flex). Зб. $\times 200$.

На частку люмінального В молекулярного підтипу із загальної вибірки припало 43 (22,28%) пацієнтки, що було майже у 2 рази менше від люмінального А підтипу (40,93%). Імуногістохімічно підтип В інвазивної протокової карциноми був розподілений на дві групи за рецепторним статусом: люмінальний В (HER-2/neu негативний, n=14) підтип і люмінальний В (HER-2/neu позитивний, n=29) підтип. Люмінальний В (HER-2/neu негативний) підтип розпізнавали за позитивними ER та/або PR, негативним HER-2/neu і високим Ki-67 (більше 20%), а люмінальний В (HER-2/neu

позитивний) підтип ідентифікували за позитивними ER та/або PR, позитивним HER-2/neu і будь-яким рівнем Ki-67 (рис. 3.2 і 3.3).

Середній вік у даній групі був 49 років (діапазон 27–73 роки), 22 (51,2%) пацієнтки були молодші 55 років. Діагностована клінічна стадія II – у 23 (53,49%) та III – у 10 (23,25%) хворих. Розподіл за Nottingham Histologic Grade був наступним: G1 – 5 (11,62%), G2 – 27 (62,79%) і G3 – 11 (25,58%) випадків. Менопаузальний статус зареєстрований у 48,8% випадків.

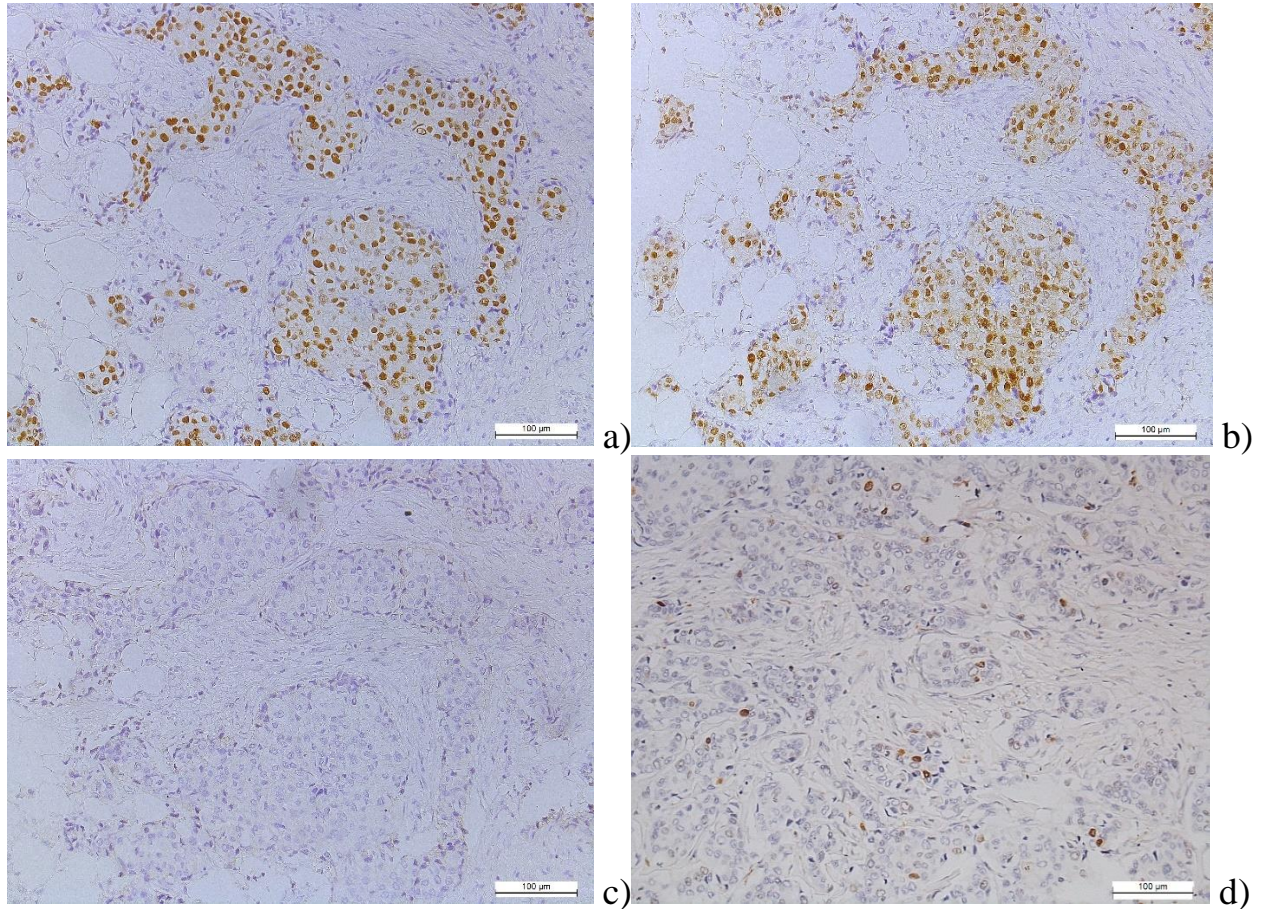


Рисунок 3.2 Інвазивна протокова карцинома грудної залози, люмінальний В підтип (HER-2/neu негативний). ІГХ. а) – позитивна ядерна експресія ER (Clone SP1, Thermo scientific); б) – позитивна ядерна експресія PR (Clone 16, Master diagnostic); в) – негативна мембранна експресія рецепторів для c-erbB-2 (негативний статус HER-2 / neu, Clone SP3, Thermo scientific); д) – позитивна ядерна експресія Ki-67 більше 20% (Clone MIB-1, Dako, Flex). Зб. $\times 200$.

Як було зазначено вище, люмінальний В підтип РГЗ є менш поширений, але до нього схильні жінки молодшого віку в порівнянні з Люмінальним А підтипом. Так, у вікових групах 30-39, 40-49, 50-59 років переважав Люмінальний В підтип і складав відповідно 11,63%, 20,93% і 37,21% пацієток в порівнянні з Люмінальним А підтипом цих же вікових груп (3,80%, 18,98% і 20,25%).

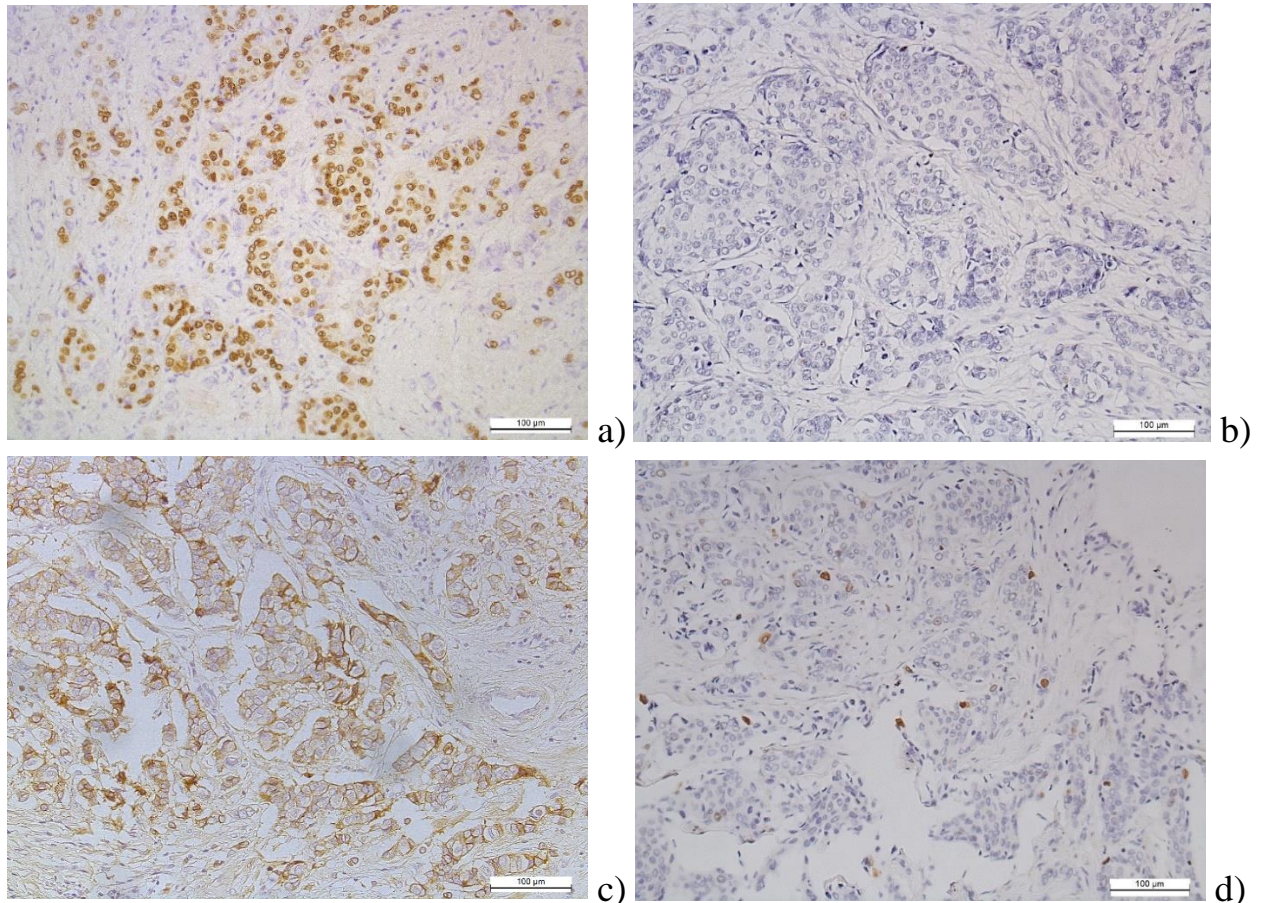


Рисунок 3.3 Інвазивна протокова карцинома грудної залози, люмінальний В підтип (HER-2/neu позитивний). ІГХ. а) – позитивна ядерна експресія ER (Clone SP1, Thermo scientific); б) – негативна ядерна експресія PR (Clone 16, Master diagnostic); в) – позитивна мембранна експресія рецепторів для c-erbB-2 (позитивний статус HER-2 / neu, Clone SP3, Thermo science); д) – позитивна ядерна експресія Ki-67 менше 20% (Clone MIB-1, Dako, Flex). 36.×200.

HER-2/neu-позитивний (нелюмінальний) підтип інвазивного протокового раку грудної залози діагностували за позитивним HER-2/neu (3+)

ампліфікованим HER-2/neu, але за відсутності експресії ER і PR (рис. 3.4). Середній вік 39 пацієнтів з HER-2/neu-позитивним (нелюмінальним) інвазивним протоковим раком грудної залози становив 50,5 років, з діапазоном 28–78 років, а 22 (56,41%) пацієнтки були молодшими за 55 років, 20 із 39 (51,28%) хворих на момент операції перебували в пременопаузі. У цьому дослідженні ми виявили, що розмір пухлини від 2 см до 5 см діагностовано у 23 хворих (58,97%), тобто переважала стадія T2 за міжнародною класифікацією TNM.

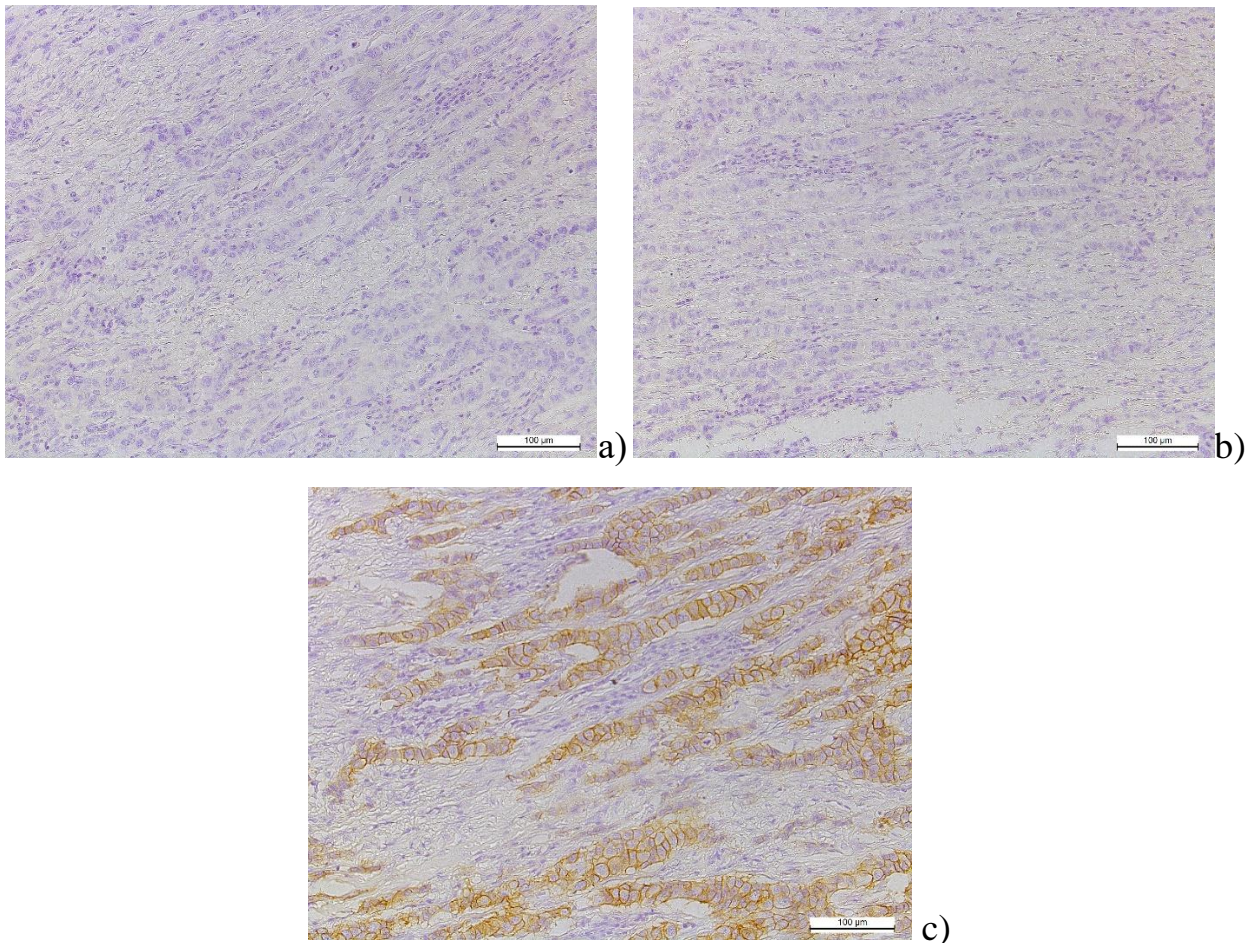


Рисунок 3.4 Інвазивна протокова карцинома грудної залози, HER-2/neu позитивний (нелюмінальний) підтип. ІГХ: а) – негативна ядерна експресія ER (Clone SP1, Thermo scientific); б) – негативна ядерна експресія PR (Clone 16, Master diagnostic); в) – позитивна мембранна експресія рецепторів для c-erbB-2 (позитивний статус HER-2 / neu, Clone SP3, Thermo science). 3б. $\times 200$.

За ступенем диференціації G пухлини розподілилися наступним чином: ступінь G1 діагностовано лише в 1 пацієнтки (2,56%), G2 – у 27 пацієнток (69,23%), G3 – в 11 пацієнток (28,21%), метастази в лімфатичні вузли були виявлені у 27 випадках (69,23%) ($p < 0,05$). У двох інтервальних групах хворих [30-39] і [50-59] років найбільший відсоток – 15,38% і 41,03% становили пацієнтки з HER-2/neu позитивним (нелюмінальним) підтипом у порівнянні з іншими підтипами РГЗ, а 71,79% пацієнток з HER-2/neu позитивним підтипом припали на груповий інтервал працездатного віку [30-59] років, що було найбільшим відсотком порівняно зі всіма підтипами в цьому віковому інтервалі [30-59]. Відсутність ER, PR і HER-2/neu ідентифікували як потрійний негативний підтип інвазивної протокової карциноми грудної залози (рис. 3.5).

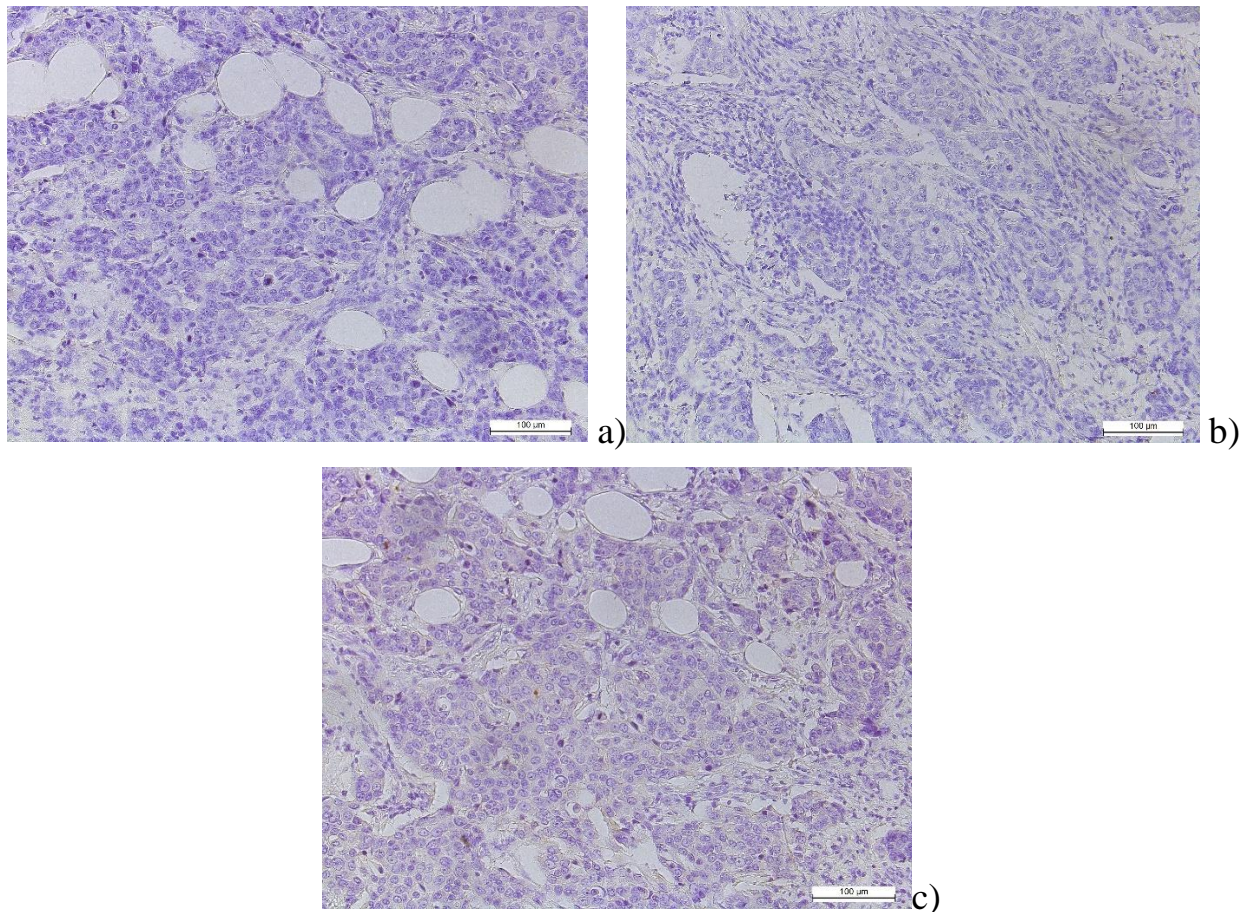


Рисунок 3.5 Інвазивна протокова карцинома грудної залози, потрійний негативний підтип. ІГХ: а) – негативна ядерна експресія ER (Clone SP1 Thermo scientific); б) – негативна ядерна експресія PR (Clone 16, Master diagnostic); в) – негативна мембранна експресія рецепторів для c-erbB-2 (негативний статус HER-2 / neu, Clone SP3, Thermo science). 3б. $\times 200$.

Пацієнтки цієї групи (n=32) мали середній вік 59 років (діапазон 31–79 років), 11 з них (34,4%) були молодші 55 років. Переважали хворі з II і III клінічними стадіями, відповідно 14 (43,74%) і 11 (34,38%) пацієнток. Розподіл за Nottingham Histologic Grade був наступним: G1 – 0 (0%), G2 – 17 (53,13%) і G3 – 14 (43,74%), G4 – 1 (3,13%) випадки. Менопаузальний статус діагностовано у 65,6% хворих. У пацієнток виявлено одностороннє ураження грудної залози зліва, частіше пухлини локалізувалися у зовнішніх верхніх або нижніх квадрантах (62,5%). Потрійний негативний підтип діагностували у всіх вікових групах, але найбільше пацієнток було у віковій групі [50-59 років] (37,5%), дещо менше у вікових групах [60-69] і [70-79 років] (по 21,87%) і найменше зареєстровано у віковому інтервалі [30-39] – 3,13%. У цьому віковому інтервалі [30-39] хворих було найменше порівняно з іншими підтипами.

Таким чином, на підставі поєднання експресії рецепторів до естрогенів, прогестерону, HER2/neu статусу та Ki-67 нами визначалися чотири основні молекулярно-генетичні підтипи: люмінальний А (позитивна експресія рецепторів до естрогенів та/або прогестерону, негативний HER2/neu статус, експресія Ki67 <20%), люмінальний В (позитивна експресія рецепторів до естрогенів та/або до прогестерону, негативний HER2/neu статус, експресія Ki67 >20%), потрійний негативний (негативна експресія рецепторів до естрогенів, прогестерону, негативний HER-2/neu статус), HER-2/neu позитивний (нелюмінальний) (негативна експресія рецепторів до естрогенів, прогестерону, позитивний HER-2/neu статус) і проводилося порівняння клініко-патологічних даних при різних молекулярних підтипах пухлини [230, 231].

3.2 Морфологічні особливості інвазивного компонента молекулярних підтипів протокового раку грудної залози

У нашому дослідженні ми використовували Міжнародну класифікацію інвазивного раку грудної залози і застосовували широко відомий термін

«протокова» карцинома замість терміну «карцинома неспецифічного типу». Термін «карцинома неспецифічного типу» був введений, щоб наголосити на відмінності цієї карциноми від раків специфічного типу. Дана термінологія має дещо формальний характер і поряд з новим терміном як синонім допускається використання і раніше прийнятих. На нашу думку, наявність «протокової» карциноми, а не «неспецифічного типу» необхідно вказувати у заключеннях, так як у метастазах пухлина може бути представлена саме цим компонентом.

Проведене нами морфологічне дослідження інвазивного компонента протокового раку грудної залози дозволило встановити внутрішньопухлинну гетерогенність і виявити структурні особливості, характерні для того чи іншого молекулярного підтипу пухлини [власні наукові праці: 230, 231]. Нами було виділено різні архітектонічні структури, а саме тубулярні (рис. 3.6), альвеолярні (рис. 3.7), трабекулярні (рис. 3.8), солідні (рис. 3.9), поодинокі пухлинні клітини або ізольовані пухлинні клітини (рис. 3.10) і змішані гістологічні структури (рис. 3.11, рис. 3.12).

Тубулярні структури з просвітом у центрі були утворені одним або двома рядами досить мономорфних клітин з нормохромними, іноді гіперхромними округлими ядрами (рис. 3.6). Цитоплазма частіше була щільною та еозинофільною. Мітотична активність сильно варіювала від повної відсутності до 5-10 і більше в одному полі зору. Структури пухлини повторювали будову проток грудної залози, однак у стромі виявлялися окремі комплекси пухлинних клітин, що підтверджувало інвазивний тип росту.

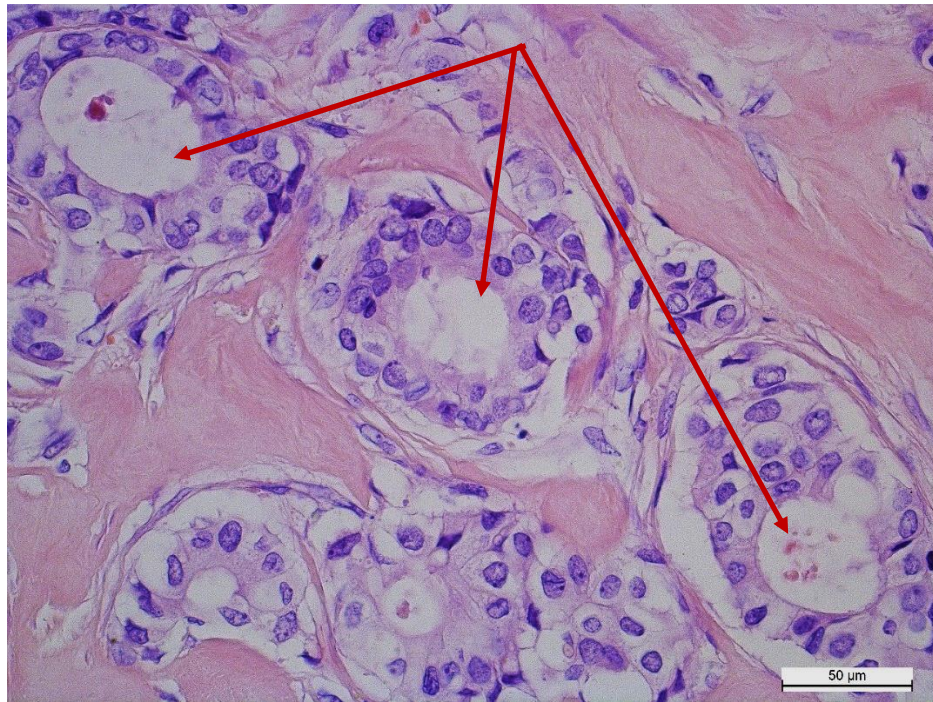


Рисунок 3.6 Типові тубулярні структури в інвазивному компоненті протокового раку грудної залози. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.×400.

У багатьох випадках помірнодиференційовані інвазивні протокові карциноми грудної залози характеризувалися формуванням альвеолярних структур. Альвеолярні структури являли собою скупчення пухлинних клітин округлої форми у вигляді шарів або декілька неправильної форми, але які нагадували округлу форму без просвіту, що відрізняло їх від тубулярних структур з просвітом. Морфологічні особливості клітин, що утворювали дані структури, характеризувалися маленьким розміром з помірно оксифільною цитоплазмою та округлими ядрами (рис. 3.7), але також діагностувалися великі клітини з гіперхромними ядрами неправильної форми та незначною кількістю цитоплазми.

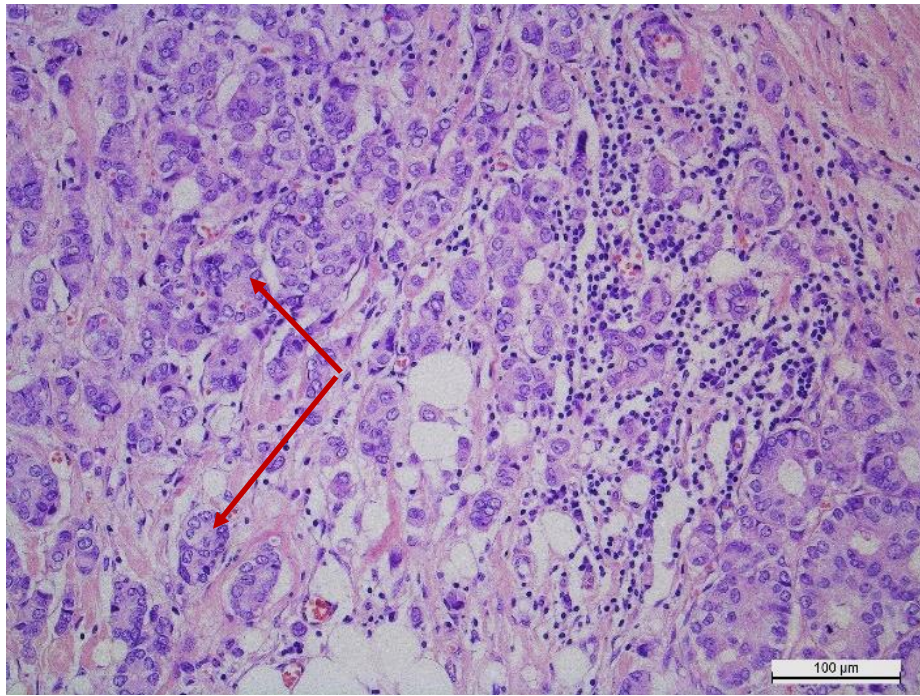


Рисунок 3.7 Альвеолярні структури в інвазивному компоненті протокового раку грудної залози. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб.×200.

Солідні структури характеризувались полями різного розміру та форми, вони розросталися у великі безформні маси. Такі структури склалися з дрібних клітин із помірною цитоплазмою і мономорфними ядрами, а також великих зі значним об'ємом кількістю цитоплазми та поліморфними гіперхромними ядрами. Крім того, солідні структури характеризувалися високою мітотичною активністю (рис. 3.8). У них з одного або декількох країв утворювалися випинання і відростки, які поступово відокремлювалися в одне або кілька лінійних утворень.

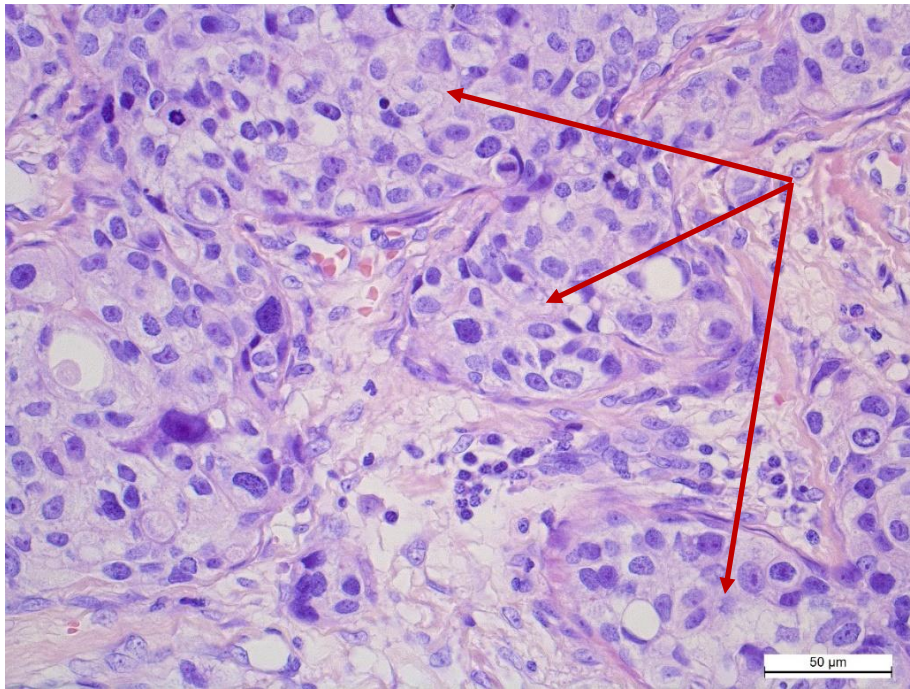


Рисунок 3.8 Солідні структури в інвазивному компоненті протокового раку грудної залози. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 400$.

Трабекулярні структури інвазивного компонента мікроскопічно виглядали лінійними короткими, утвореними одним рядом дрібних, досить мноморфних клітин. Крім того, також діагностувалися довгі й широкі лінійні трабекулярні структури, які склалися з 2-3 рядів клітин середнього розміру, з округлими нормохромними або гіперхромними ядрами (рис. 3.9).

Діагностувалися також кластери з декількох клітин, різні за морфологією та гіперхромними ядрами, подекуди зустрічалися поодинокі пухлинні клітини в гіалінізованій стромі (рис. 3.10).

Дуже часто інвазивний компонент мав змішану будову, складався з двох, трьох, чотирьох і більше різних цитоархітектонічних структур (рис. 3.11, рис.3.12). При цьому одночасно діагностували трабекулярні, солідні, альвеолярні, тубулярні структури та окремо розташовані групи пухлинних клітин і навіть поодинокі пухлинні клітини.

Стромальний компонент пухлини відзначався виразністю запальної інфільтрації та наявністю гіалінозу, причому виразність запальної інфільтрації відрізнялася як внутрішньопухлинно, так і по периферії інвазії і залежала від

молекулярного підтипу протокової карциноми. Пухлини характеризувалися як мінімальною (рис. 3.14), так і помірною (рис. 3.11, рис. 3.12) чи виразною запальною інфільтрацією (рис. 3.13). Гіаліноз строми також відрізнявся за виразністю поширення (рис. 3.10, рис. 3.15).

Потрібно звернути увагу, що мікроскопічне дослідження у кожному випадку показало різну кількість типів морфологічних структур в інвазивному компоненті або переважання тих чи інших, що асоціювалося з молекулярним підтипом протокового раку грудної залози. Мінімум в пухлині міг визначатися один тип структур, максимум – всі п'ять різних гістологічних типів.

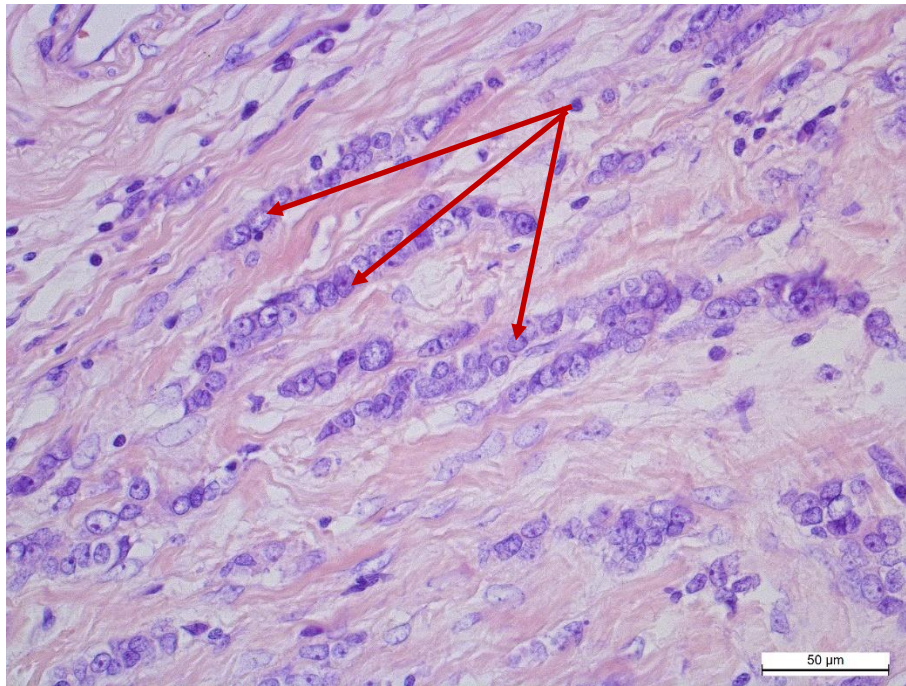


Рисунок 3.9 Трабекулярні структури в інвазивному компоненті протокового раку грудної залози. Забарвлення гематоксиліном та еозином. 36.×400.

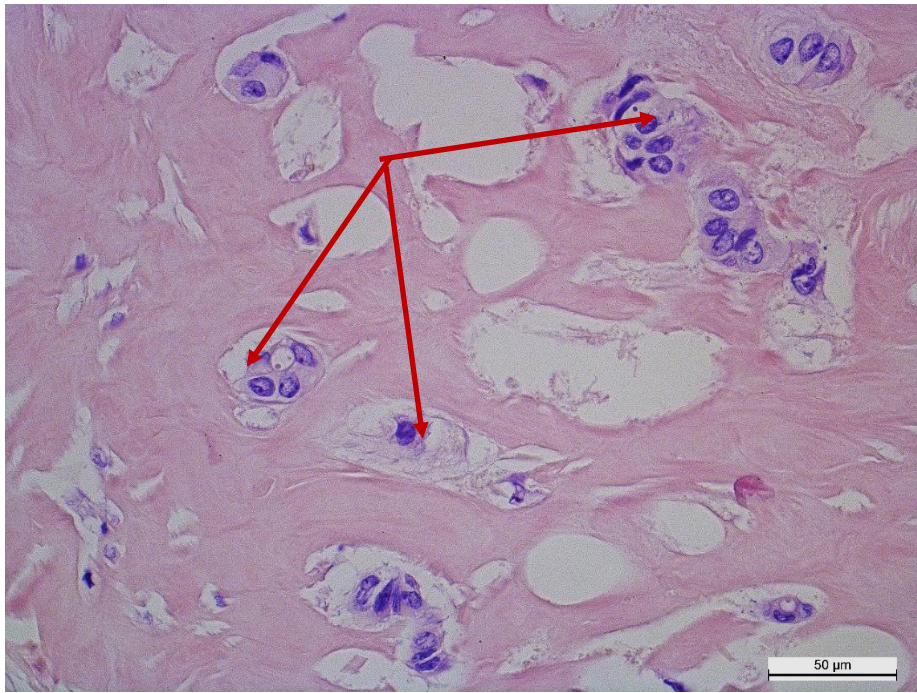


Рисунок 3.10 Окремі групи клітин і виразна гіалінізована строма в інвазивному компоненті протокового раку грудної залози. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 400$.

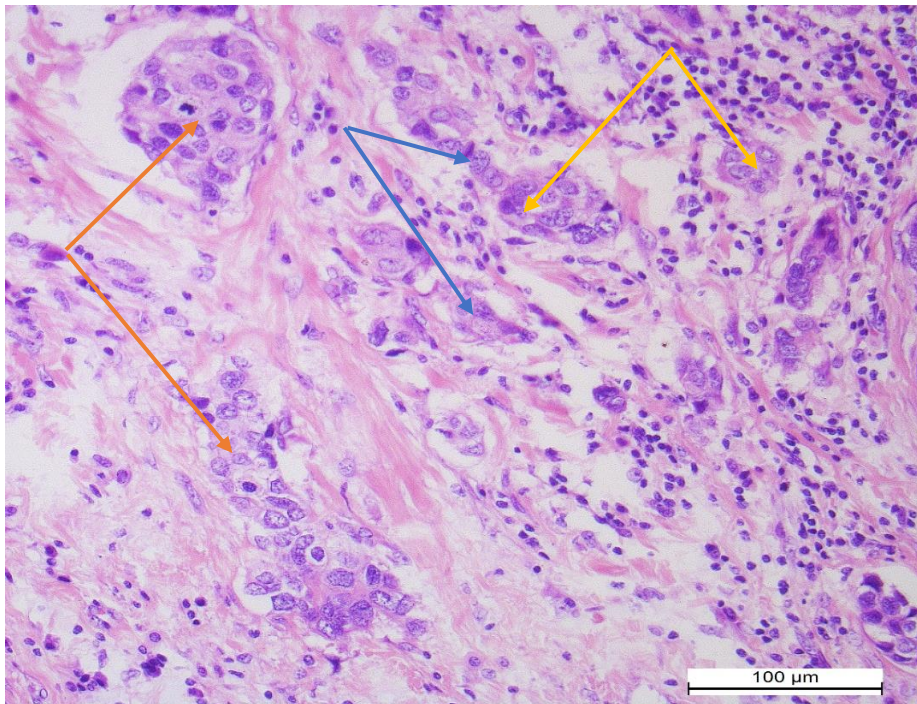


Рисунок 3.11 Інвазивний компонент протокової карциноми грудної залози представлений солідними (помаранчева стрілка), трабекулярними (синя стрілка) та альвеолярними (жовта стрілка) структурами. Помірна запальна інфільтрація строми. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 200$.

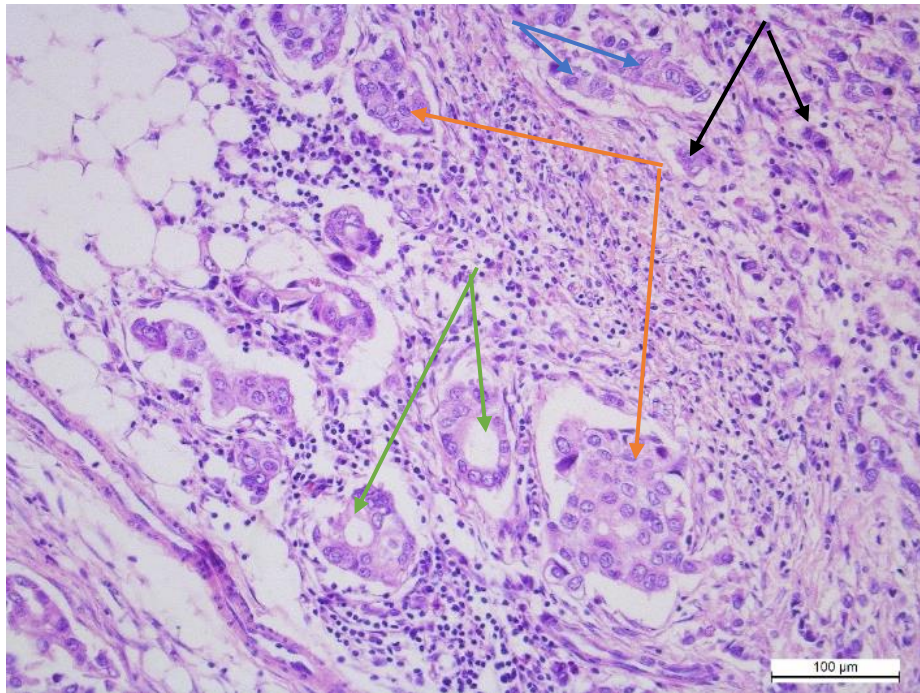


Рисунок 3.12 Інвазивний компонент протокової карциноми грудної залози змішаної будови, представлений тубулярними (зелена стрілка), солідними (помаранчева стрілка), трабекулярними (синя стрілка) структурами та окремими групами пухлинних клітин (чорна стрілка). Помірна запальна інфільтрація стромы. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 200$.

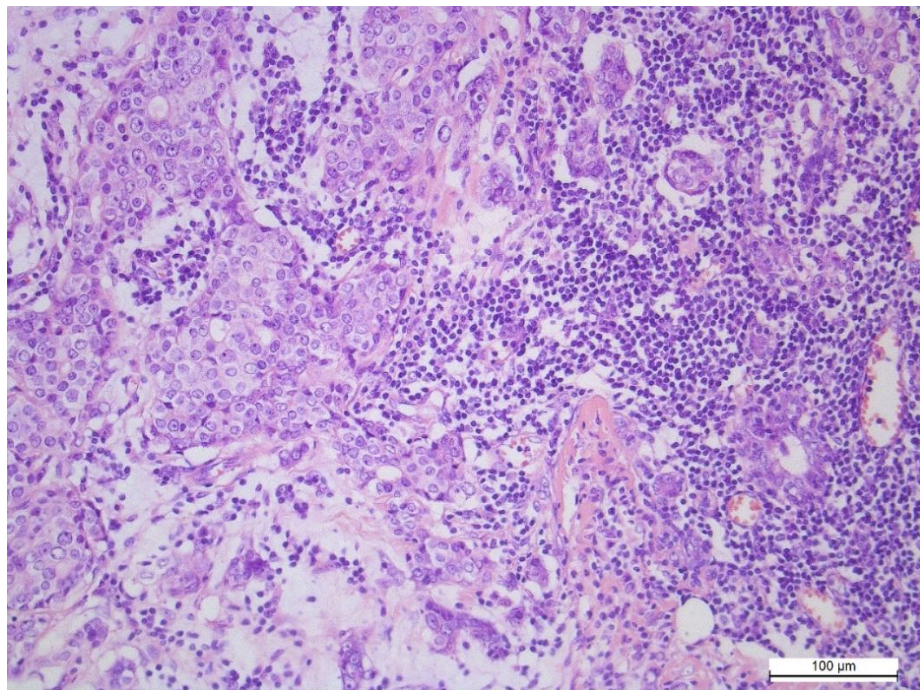


Рисунок 3.13 Інтенсивна запальна інфільтрація стромы інвазивної протокової карциноми грудної залози. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 200$.

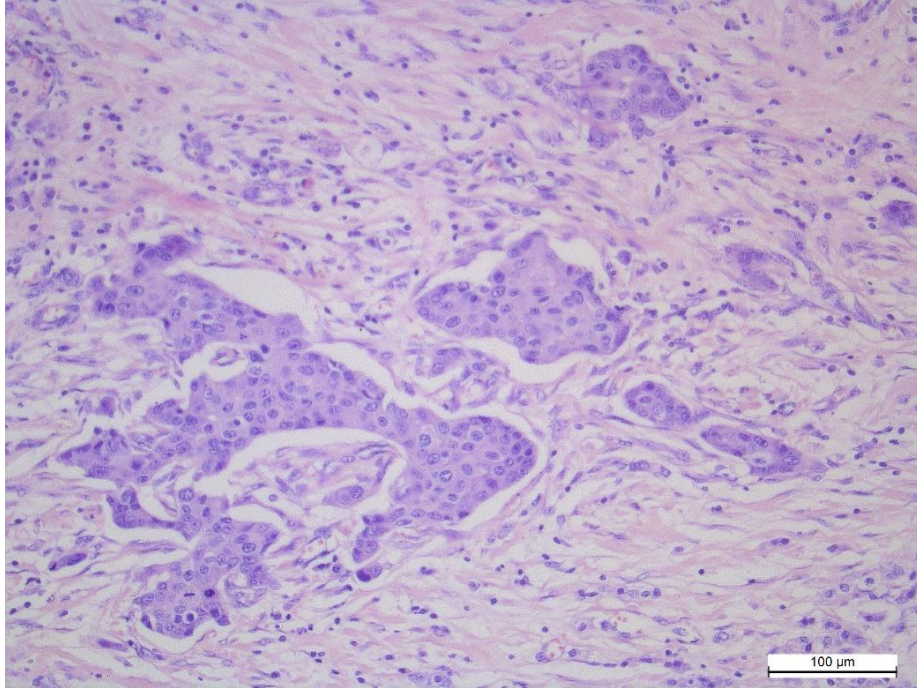


Рисунок 3.14 Мінімальна запальна інфільтрація стромы інвазивної протокової карциноми грудної залози. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 200$.

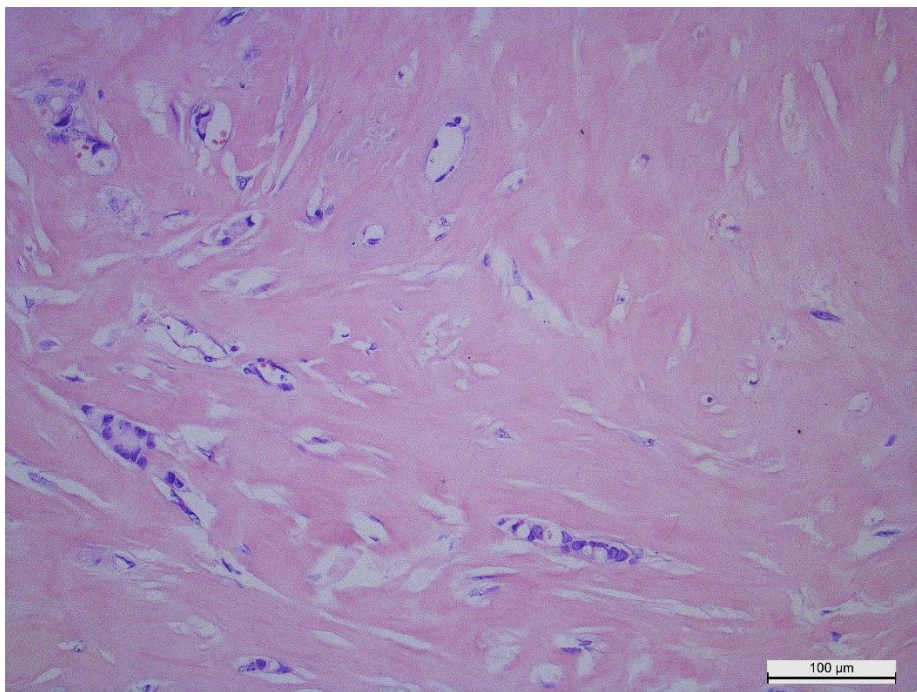


Рисунок 3.15 Виражений гіаліноз стромы протокової карциноми грудної залози. Інвазивний компонент представлений окремими невеликими групами пухлинних клітин. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 200$.

При дослідженні інвазивного компоненту протокової карциноми люмінального А підтипу нами було виділено переважно змішану будову, представлену різними гістологічними структурами. Тільки у двох випадках інвазивний компонент характеризувався лише наявністю одного виду структур і це були низькодиференційовані карциноми. У 32% випадків інвазивний компонент складався з чотирьох різних структур і в 24% - з трьох, тобто у більше половини випадків одночасно діагностували різні гістологічні типи - трабекулярні, солідні, альвеолярні, тубулярні структури. Наявність всіх п'яти типів структур діагностували лише у 16% карцином, і це були високодиференційовані пухлини, а наявність двох типів – у 20% випадків карцином з розміром пухлини T2. Розподіл різних типів структур в інвазивному компоненті протокової карциноми грудної залози люмінального А підтипу представлено на рис. 3.16.

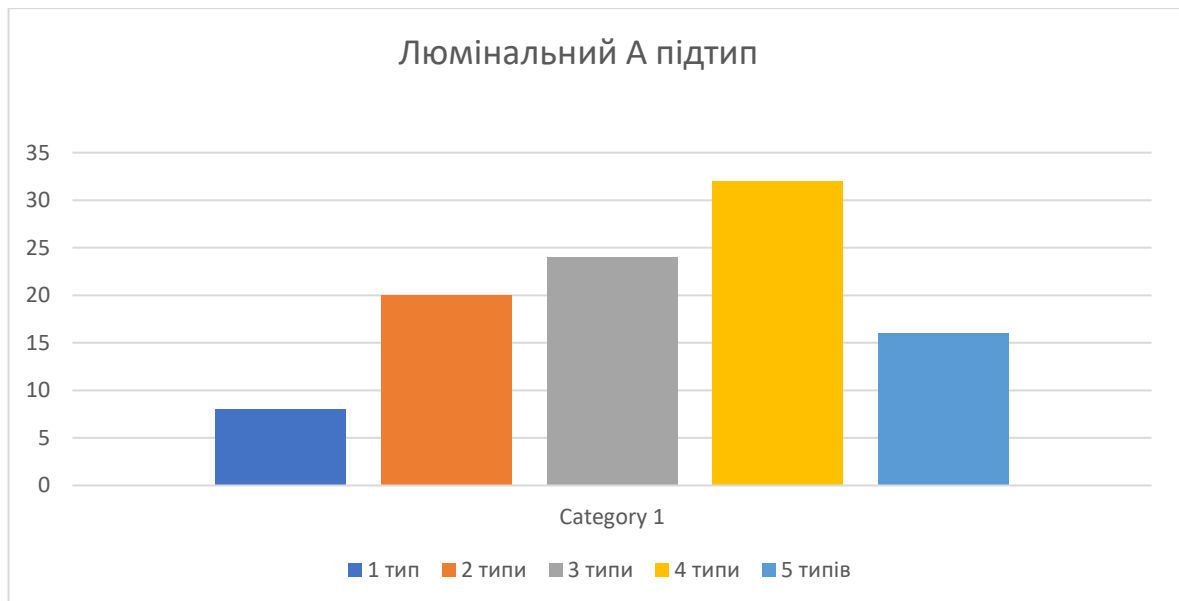


Рисунок 3.16 Різна кількість архітектонічних типів структур в інвазивному компоненті протокової карциноми грудної залози, переважання змішаної будови (чотири типи гістологічних структур).

В інвазивному компоненті люмінального В підтипу протокового раку також діагностували альвеолярні, тубулярні, трабекулярні солідні структури і в багатьох випадках одночасно були різні структури.

Змішану будову з трьох і чотирьох типів структур діагностували відповідно в 36,4 % і в 22,7 % випадках. Найменша кількість випадків характеризувалася наявністю одного типу структур (9,09%) і всіх п'яти типів (13,64%). Розподіл гістоархітектонічних типів структур в інфільтративному компоненті протокової карциноми грудної залози люмінального В підтипу представлено на рис. 3.17.

Що стосується Her-2/neu позитивного молекулярного підтипу, то потрібно наголосити, що переважали випадки, коли в інвазивному компоненті були наявні два і три типи гістоархітектонічних структур, що склало, відповідно по 31,58%. Наявність структур солідного типу діагностувалась у 21,05% випадків, а наявність чотирьох різних структур, тобто розмаїття гістологічної будови зустрічалось рідко і було діагностовано тільки у 15,79% випадків. П'ять різних типів структур в інфільтративному компоненті не зустрічались.

Наявність одного типу структур була характерною для випадків з низьким ступенем диференціювання і великим розміром пухлини і, навпаки, розмаїття інвазивного компоненту з чотирьох типів було характерне для високодиференційованих пухлин, але таких випадків було мало.

Розподіл структур в інвазивному компоненті протокової карциноми грудної залози Her-2/neu+ представлено на рис. 3.18.

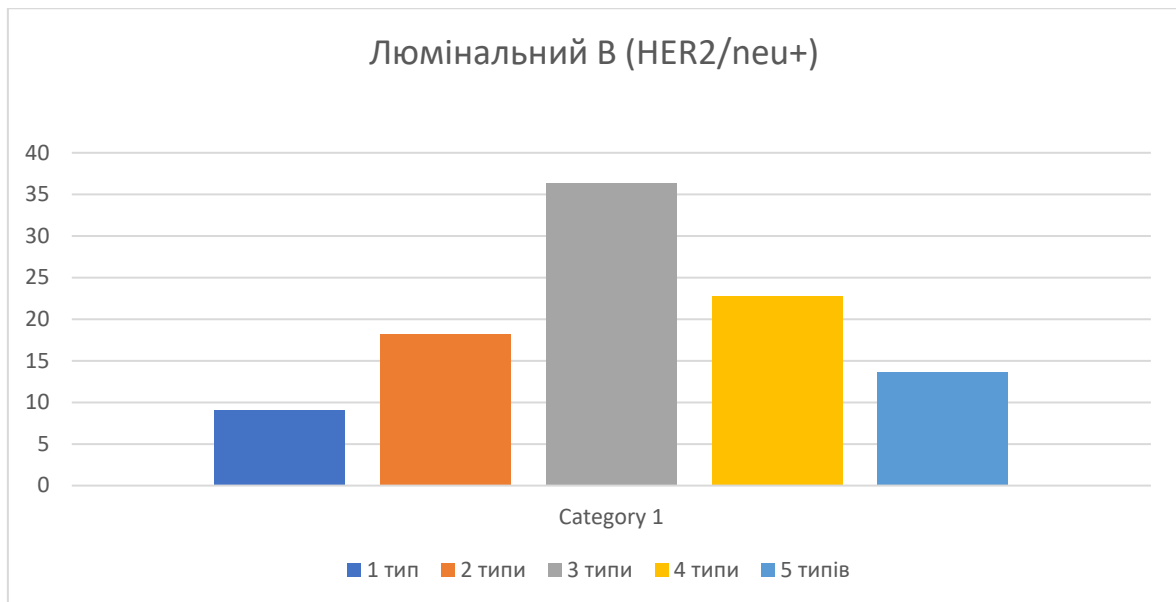


Рисунок 3.17 Переважання випадків протокової карциноми грудної залози зі змішаною будовою інвазивного компоненту (3 типи структур).

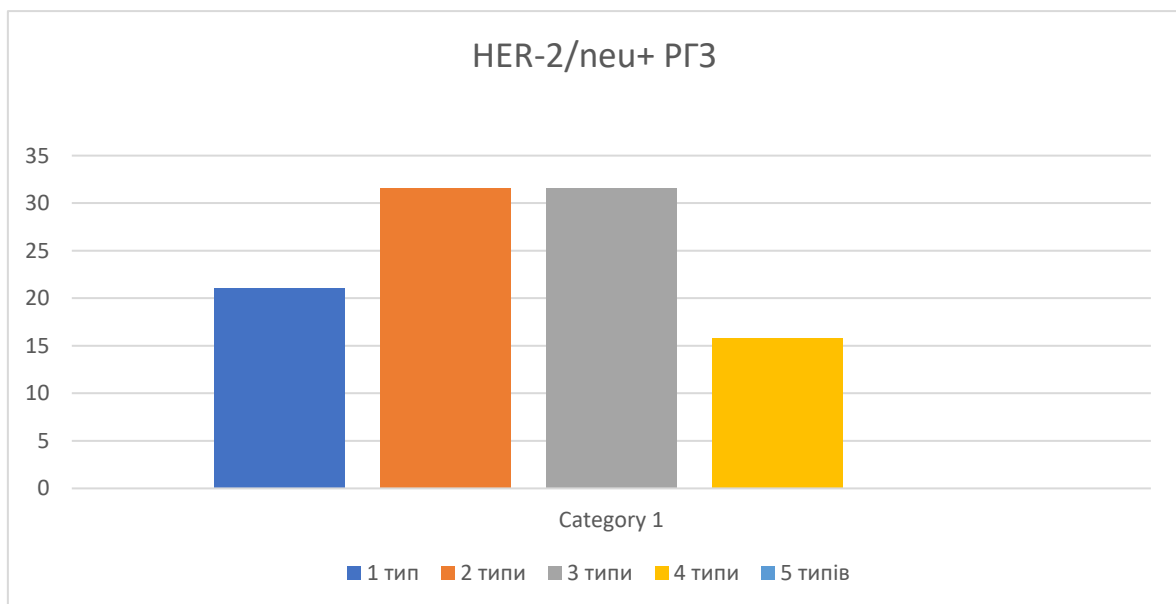


Рисунок 3.18 Розподіл Her-2/neu+ молекулярного протокового раку грудної залози згідно кількості архітектонічних типів структур в інвазивному компоненті.

Потрійний негативний молекулярний підтип протокового раку характеризувався переважанням одного типу гістологічних структур в інвазивному компоненті, що склало 40% від усіх випадків цієї групи. Один тип

структур, частіше солідний, переважав при низькому ступені диференціювання пухлин, за наявності пухлинного процесу в лімфатичних вузлах. Наявність одночасно двох чи трьох типів структур діагностувалася однаково і склала по 20% випадків, відповідно. Характерним було те, що у пацієток без ураження лімфатичних вузлів переважав інвазивний компонент, який мав змішану будову, складався з чотирьох і п'яти морфологічних структур, але таких випадків було дуже мало (по 10% кожного типу). Морфологічний аналіз показав, що тубулярні структури дуже рідко діагностувалися в інвазивному компоненті потрійного негативного підтипу протокового раку грудної залози. Натомість наявність альвеолярних і солідних структур найчастіше виявляли у випадках з пухлинним ураженням лімфатичних вузлів. Розподіл різних гістоархітектонічних типів структур в інвазивному компоненті протокової карциноми грудної залози потрійного негативного підтипу представлено на рис. 3.19.

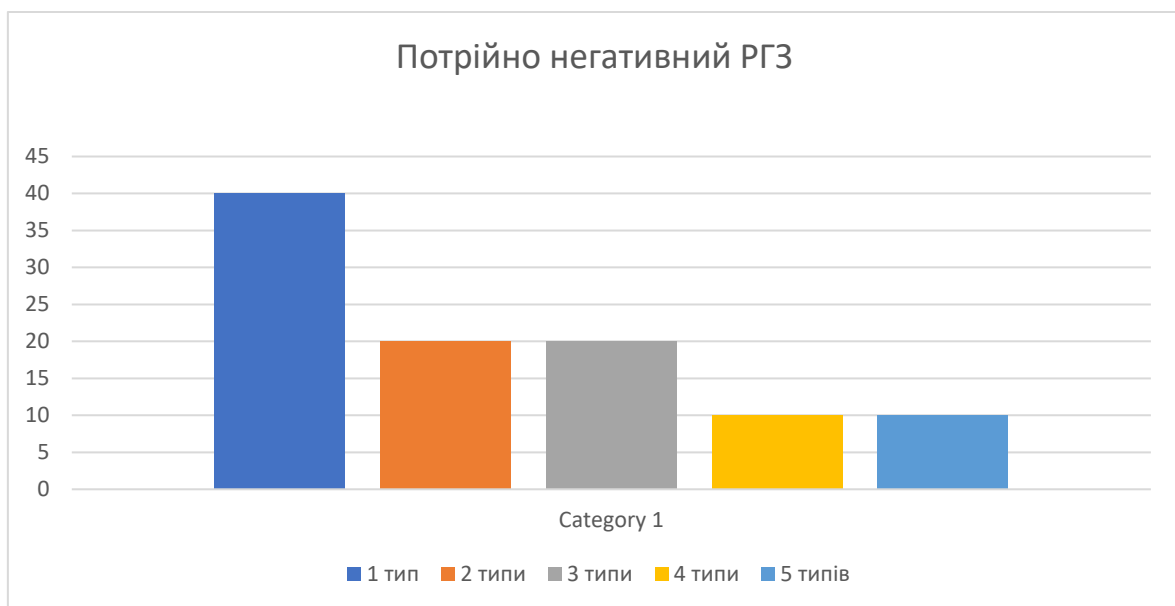
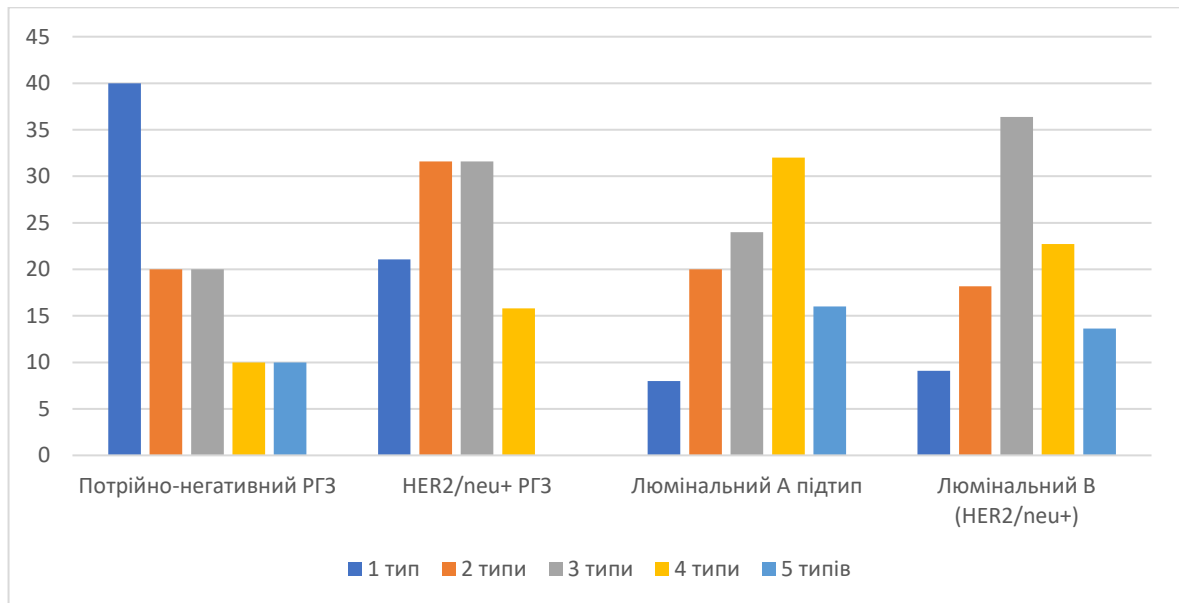


Рисунок 3.19 Переважання випадків протокової карциноми грудної залози з солідною будовою інвазивного компоненту (один тип структур).

При проведенні порівняльного аналізу молекулярних підтипів інфільтративного протокового раку грудної залози було діагностовано різну кількість типів морфологічних структур в інвазивному компоненті з переважанням одного типу чи змішаних морфологічних структур, що представлено на рис. 3.20.



Примітка. * – доведена різниця ($p < 0,05$) показників 1 групи з іншими групами

Рисунок 3.20. Порівняння частоти переважання різних типів структур в інвазивному компоненті у досліджуваних групах (%)

Нами також проведено порівняння кількості типів морфологічних структур в інвазивному компоненті серед різних молекулярних підтипів протокового РГЗ (рис. 3.21). Було встановлено достовірне переважання гістологічних структур одного типу в потрійному негативному РГЗ в 1,9 раза порівняно з Her-2/neu+, у 5 разів – порівняно з люмінальним А підтипом, в 4,4 раза – порівняно з люмінальним В підтипом ($p < 0,05$).

Два типи гістологічних структур у найбільшій кількості випадків діагностувалися у пацієнтів з Her-2/neu+ молекулярним раком і достовірно переважали в 1,6 раза порівняно з потрійним негативним і люмінальним А підтипами і в 1,7 раза – порівняно з люмінальним В. Три типи структур переважали у хворих з люмінальним В раком, в 1,82 раза частіше

діагностувалися, ніж в потрійному негативному, в 1,52 раза частіше зустрічалися, ніж в люмінальному А раку і в 1,15 раза – ніж в Her-2/neu+ РГЗ. Чотири типи гістологічних структур або змішана морфологічна картина найчастіше діагностувалася у пацієток з люмінальним А раком і переважала в 3,2 раза, ніж у хворих з потрійним негативним раком, у 2,03 раза частіше діагностувалася, ніж в Her-2/neu+ РГЗ і в 1,41 раза – ніж у хворих з люмінальним В раком. Наявність всіх п'яти типів гістологічних структур також була характерною для люмінального А раку і переважала в 1,6 раза в порівнянні з потрійним негативним і в 1,2 раза в порівнянні з люмінальним В раком.

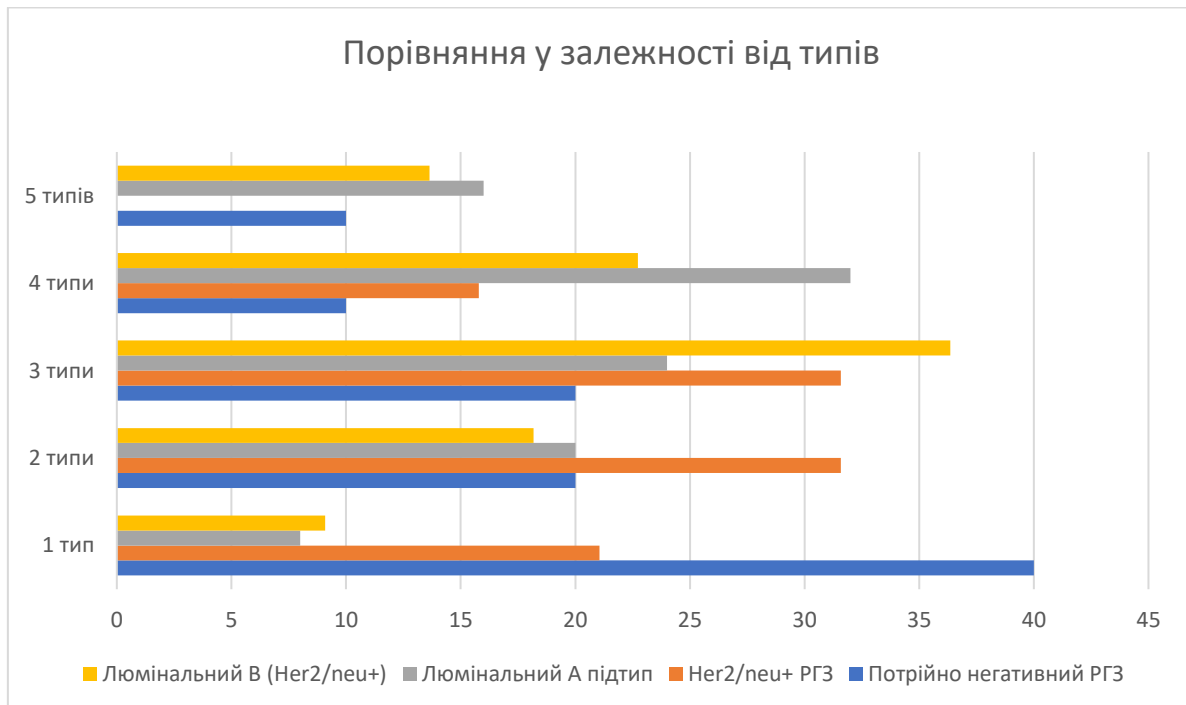


Рисунок 3.21 Порівняльний аналіз наявних типів гістологічних структур в інвазивному компоненті протокового раку грудної залози.

Для встановлення кореляційних зв'язків між прогностичними характеристиками різних молекулярних підтипів протокового раку грудної залози і наявністю морфологічних структур змішаних чи одного або двох типів, а також кореляційних зв'язків всередині кожного молекулярного підтипу нами проведені статистичні дослідження. Для оцінки взаємозв'язку і впливу ознак використовували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (R).

Кореляційні зв'язки між морфологічними структурами і прогностичними параметрами люмінального А РГЗ продемонстрували наступне: наявність змішаних морфологічних структур в інфільтративному компоненті (5 типів і 4 типи) характеризувалася прямою помірною кореляцією з високодиференційованими карциномами G1 ($r= +0,60$; $p=0,001$) і з розміром пухлини T1 ($r= +0,45$; $p=0,02$). Два і три типи морфологічних структур корелювали з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів і більшим розміром пухлини. Виявлено прямий помірний кореляційний зв'язок з T2 ($r= +0,38$; $p=0,05$) та високий – з N1 ($r= +0,73$; $p=0,00003$). Наявність структур одного типу помірно корелювала зі ступенем диференціації пухлини (G) ($r= +0,60$; $p=0,001$), а з G3 ступінь кореляції був найвищий ($r= +1$).

При визначенні кореляційних зв'язків між морфологічними структурами і прогностичними параметрами потрібного негативного молекулярного підтипу РГЗ було встановлено пряму помірну кореляцію між наявністю трьох, чотирьох, п'яти гістоархітектонічних типів структур і ступенем диференціації G2 ($r= +0,41$; $p=0,07$), розміром пухлини T1 ($r= +0,45$; $p=0,04$), крім того, між наявністю п'яти типів структур та N0 ($r= +0,41$; $p=0,007$). Один тип структур помірно корелював з G3 ($r= +0,47$; $p=0,04$).

Результати пошуку кореляційного зв'язку у випадках з Her-2/neu+ раку грудної залози показали різний напрямок. Виявлено прямий помірний кореляційний зв'язок між структурами одного типу та розміром пухлини T3 ($r= +0,66$; $p=0,002$) і між структурами одного типу та ступенем диференціації G3 ($r= +0,61$; $p=0,01$). Два і три типи морфологічних структур продемонстрували негативний помірний кореляційний зв'язок з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів N2 ($r= -0,64$; $p=0,002$) і ступенем диференціації G3 ($r= -0,58$; $p=0,001$). Наявність змішаних морфологічних структур в інфільтративному компоненті (4 типи) позитивно помірно корелювали зі ступенем диференціації G1 ($r= +0,54$; $p=0,02$).

Що стосується визначення кореляційних зв'язків у люмінальному В раку грудної залози, то необхідно вказати наявність прямого помірного зв'язку між

структурами одного типу та розміром пухлини T1 ($r= +0,46$; $p=0,03$) і високого прямого зв'язку між структурами одного типу та N0 ($r= +0,80$; $p=0,0002$). Два типи морфологічних структур в інфільтративному компоненті корелювали з високодиференційованими пухлинами G1 ($r= +0,46$; $p=0,03$), а вже три типи морфологічних структур в інфільтративному компоненті корелювали з помірнодиференційованими пухлинами G2 ($r= +0,41$; $p=0,05$), чотири і п'ять типів структур, тобто наявність змішаних морфологічних структур корелювали з N2 ($r= +0,65$; $p=0,002$) і ступенем диференціації G3 ($r= +0,84$; $p=0,0001$), відповідно.

3.3 Скануюча електронна мікроскопія молекулярних підтипів інфільтративного протокового раку грудної залози

Матеріалом для дослідження слугували зразки тканини 12 випадків інвазивного протокового раку грудної залози, відібрані із загальної вибірки методом випадкових чисел. У всіх випадках діагноз був верифікований гістологічно. При світловій мікроскопії в інвазивному компоненті виявлено гістологічні структури, такі як тубулярні, трабекулярні, солідні, альвеолярні структури і дискретні чи поодинокі групи пухлинних клітин. Тубулярні структури нагадували собою трубки, утворені одним рядом пухлинних клітин (рис. 3.22 а). Трабекулярні структури представляли один-два ряди лінійно розташованих клітин (рис. 3.25 а). Солідні структури виглядали як поля, що складаються з десятків і сотень пухлинних клітин (рис. 3.23 а, б). Альвеолярні структури представляли собою формування пухлинних клітин округлої або близької до округлої форми (рис. 3.24 а). Дискретні, чи поодинокі, групи пухлинних клітин визначалися як окремі пухлинні клітини або скупчення від двох до чотирьох-п'яти клітин (рис. 3.25 б). За ступенем злоякісності інвазивні протокові карциноми розподілилися наступним чином: G1 – $n=3$ (25,00% [5,68-52,11]); G2 – $n=5$ (41,67% [16,54-69,4]); G3 – $n=4$ (33,33% [10,66-61,2]).

Скануюча електронна мікроскопія показала наявність поодиноких клітин та скупчень пухлинних клітин різного розміру. Кластери клітин мали

неправильну форму, нагадували сферичну, утворювали щільні окремі ряди. Були помітні відмінності у розмірі та формі клітин, що утворюють кластери. Поверхні клітини в деяких кластерах чи скупченнях були досить плоскими і щільно прилягали або були розмежовані глибокими інвагінаціями. Конфігурація вільної поверхні клітин, що утворюють скупчення, була досить мінливою. У деяких випадках вся видима поверхня була вкрита численними, неоднорідними мікрворсинками різної висоти, розмірів та щільності. Здебільшого такі мікрворсинки вкривали лише частину поверхні клітини. Були також скупчення із зовнішніми вільними клітинними поверхнями, вкритими поодинокими розсіяними несиметричними мікрворсинками, інколи вони були повністю відсутніми. В інфільтруючих протокових карциномах трабекулярного типу пухлинні клітини розташовувались щільно упакованими рядами. Такі клітини, як правило, мали гладкі поверхні з рідкісними мікрворсинками (рис. 3.25 с). Поодинокі відокремлені пухлинні клітини, як правило, були сферичними і мали різний розмір. Конфігурація їх поверхні була подібна до поверхні клітин, що утворюють кластерні скупчення, тобто вони були або покриті несиметричними мікрворсинками, розсіяними по всій поверхні клітини, або мали неправильну конфігурацію поверхні без мікрворсинок (рис. 3.25 d).

Ми провели порівняння конфігурації поверхні пухлинних клітин з різним гістологічним ступенем злоякісності [власні дослідження 232]. Із точки зору поверхневої конфігурації пухлинних клітин нами виділено три варіанти клітин. Варіант I характеризувався наявністю у більшості пухлинних клітин численних асиметричних мікрворсинок, які були дифузно розташовані на поверхні клітин або зустрічалися вогнищево (рис. 3.22 b, c). Варіант II характеризувався наявністю незначної кількості асиметричних мікрворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні (рис. 3.23 c, d; рис. 3.25 c, d). Варіант III характеризувався відсутністю мікрворсинок на поверхні більшості пухлинних клітин (рис. 3.24 b, c, d). Ми визначили 5 випадків (41,67% [16,54-69,4]) раку грудної залози I варіанту, 2 (16,67% [1,88-41,84]) –

II варіанту та 5 (41,67% [16,54-69,4]) – III варіанту. Електронно-мікроскопічні особливості інвазивного протокового РГЗ при скануючій мікроскопії порівнювали в кожному випадку з G. Обробка даних проводилася за допомогою програми R Commander. Отримані показники представлено у вигляді часток та 95% довірчих інтервалів (% [95%ДІ]). Довірчі інтервали вираховували за критерієм-ф кутового перетворення Фішера. Достовірність різниці визначали методом точного критерію Фішера, при мінімальному рівні значимості $p < 0,05$. Результати дослідження подано у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

Розподіл варіантів клітин при різному гістологічному ступені зляжкності (% [95%ДІ])

Гістологічний ступінь зляжкності (G)	Варіант клітин I		Варіант клітин II		Варіант клітин III		Всього	
	n	% [95%ДІ]	n	% [95%ДІ]	n	% [95%ДІ]	n	%
G1	3	100,00%	0	0%	0	0%	3	100,00%
G2	2	40,00% [5,95-81,25]	1	20,00% [0,06-61,55]	2	40,00% [5,95-81,25]	5	100,00%
G3	0	0%*	1	25,00% [0,11-72,04]	3	75,00% [27,96-99,89]	4	100,00%
Всього	5	41,67% [16,54-69,4]	2	16,67% [1,88-41,84]	5	41,67% [16,54-69,4]	12	100,00%

Високо диференційовані інвазивні протокові карциноми G1 характеризувалися наявністю у більшості пухлинних клітин численних асиметричних мікроворсинок, які були дифузно розподілені на поверхні клітин або зустрічалися вогнищево. Варіант I переважав за наявності

тубулярних структур в інвазивному компоненті протокових карцином грудної залози (рис. 3.22 а).

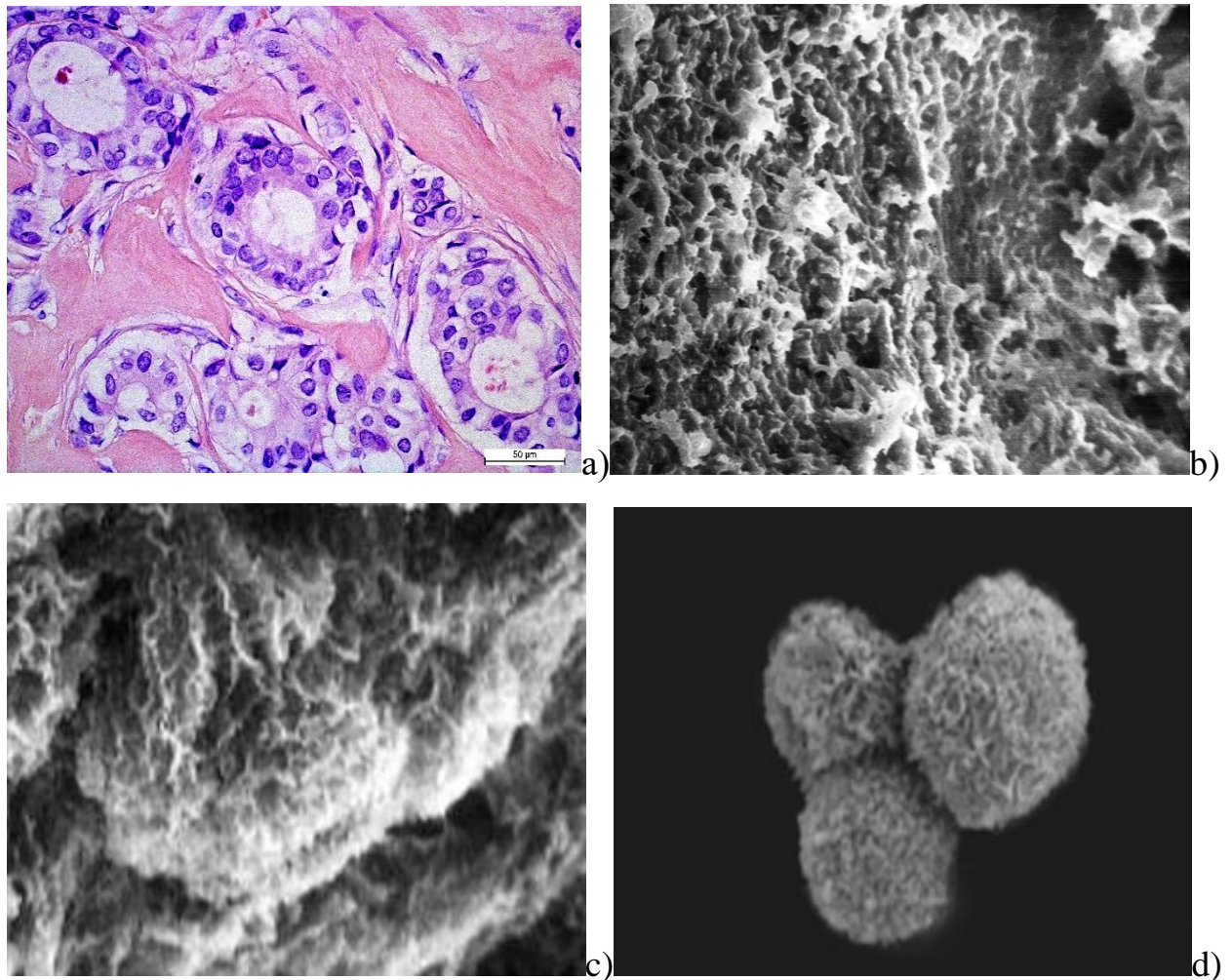


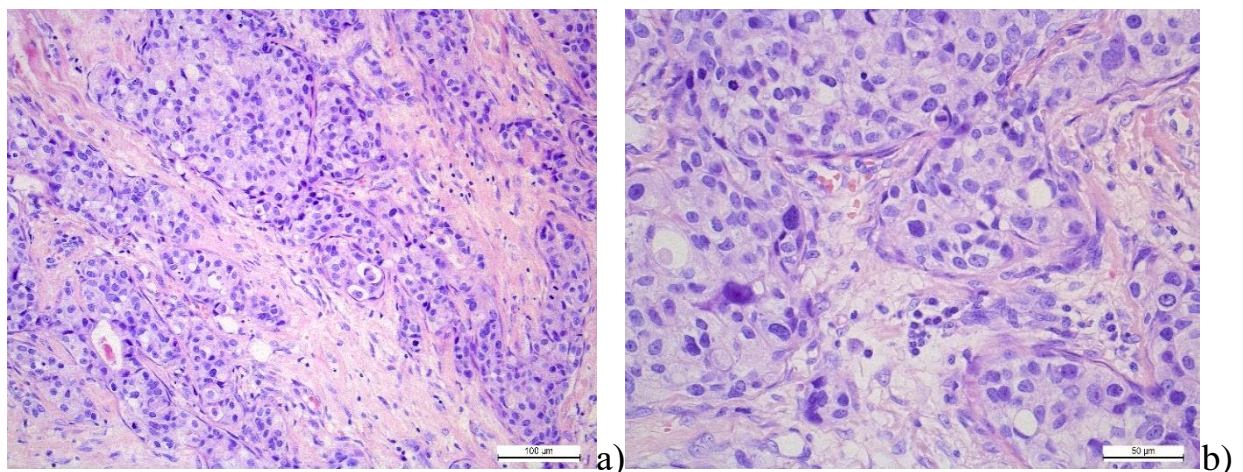
Рисунок. 3.22 Інвазивна протокова карцинома грудної залози: типові тубулярні структури в інфільтративному компоненті, гістологічно G2 ступінь злоякості. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 400$ (а); скануюча електронна мікроскопія, I варіант поверхневої конфігурації, численні асиметричні мікротрабекулярні цитоплазматичні вирости покривають цілі вільні поверхні клітин (b-c), скупчення, утворене невеликими округлими клітинами, які вкриті щільно упакованими мікрворсинками (d). Зб. (b) $\times 725$; (c) $\times 800$; (d) $\times 3500$.

Помірно диференційовані карциноми G2 (40,00% [5,95-81,25]) характеризувалися розмаїтстю поверхневої геометрії пухлинних клітин. Для

них була характерна як присутність численних асиметричних мікрворсинок, так і їх повна відсутність. Подекуди можна було зафіксувати дуже малу кількість асиметричних мікрворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні. I варіант був характерний для люмінального A і B підтипів.

Другий варіант був характерний для солідного, трабекулярного і тубулярного компоненту інвазивних протокових карцином грудної залози ступенів злякисності G2 (20,00% [0,06-61,55]) і G3 (25,00 % [0,11-72,04]) (рис. 3.23 а, б; рис. 3.25 а, б).

Що стосується низько диференційованих карцином G3, то потрібно наголосити, що у 75,00% [27,96-99,89] випадків характерною була відсутність у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні, тобто мав місце III варіант поверхневої конфігурації клітин. І тільки в поодиноких випадках зустрічалася дуже мала кількість асиметричних мікрворсинок, які розсіяні по всій клітинній поверхні. II варіант переважав в Her-2/neu молекулярному підтипі і потрійному негативному підтипі.



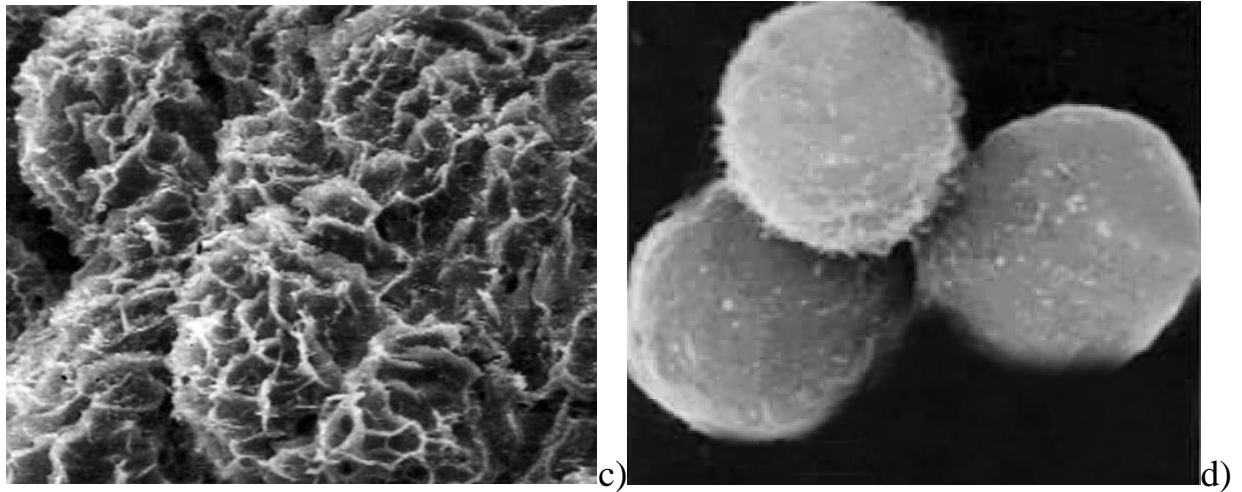
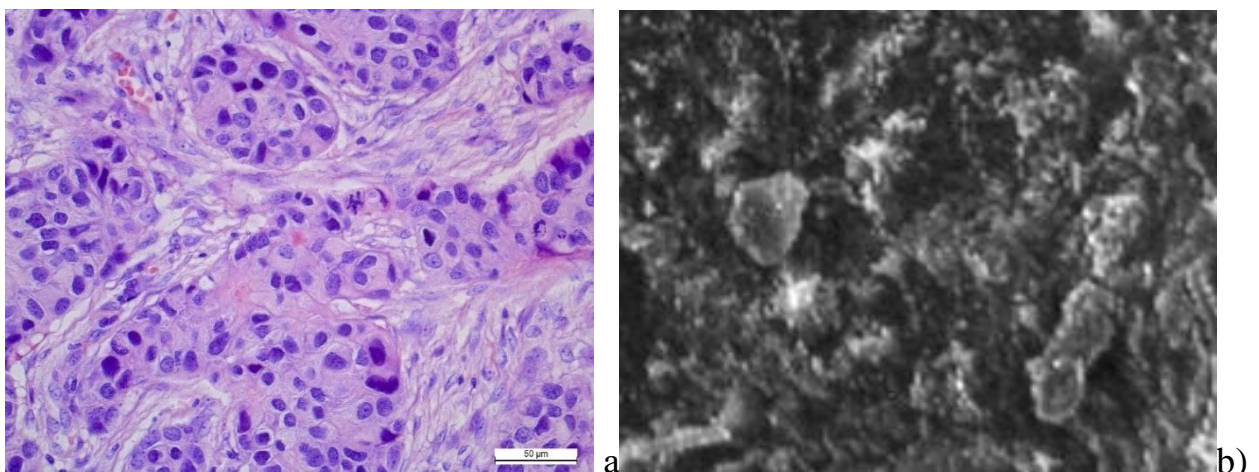


Рисунок 3.23 Інвазивна протокова карцинома грудної залози: солідні структури в інфільтративному компоненті, виражений клітинний поліморфізм, гіперхромія ядер, численні мітотичні фігури, гістологічно G3 ступінь злякисності (а, б). Забарвлення гематоксилином та еозином. Зб. (а)×200, (б)×400; скануюча електронна мікроскопія, скупчення пухлинних клітин переважно округлої форми, II варіант поверхневої конфігурації, рідкісні мікротрабекулярні цитоплазматичні вирости (с) і мала кількість мікрворсинок на поверхнях пухлинних клітин (d). Зб. (с) ×700, (d) ×3500.

Третій варіант поверхневої конфігурації характеризувався наявністю переважно альвеолярних структур в інфільтративному компонентів (рис. 3.24 а) і зустрічався при Her-2/neu молекулярному підтипі і потрійному негативному підтипі, і в окремих випадках люмінального А підтипу.



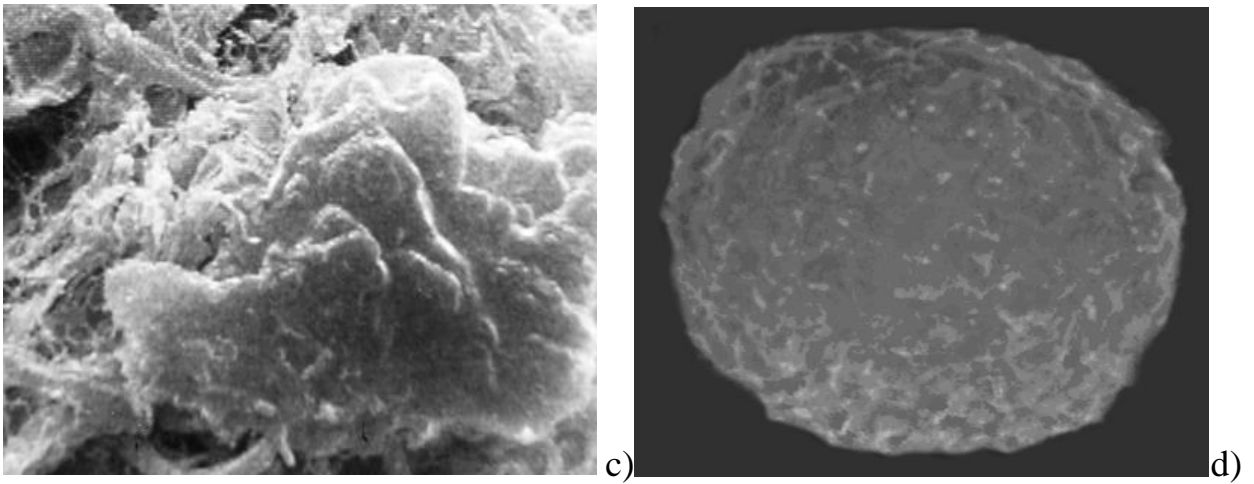
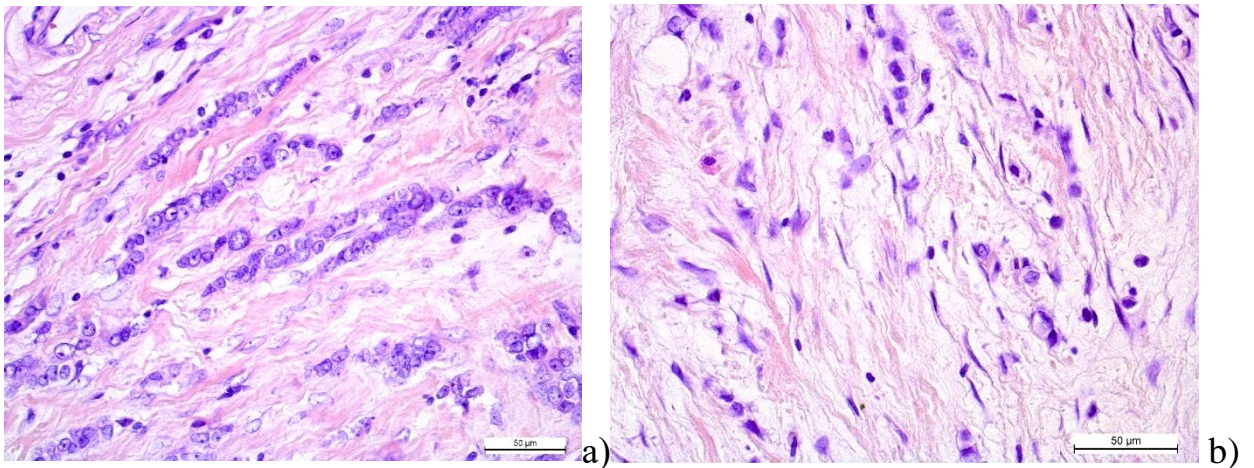


Рисунок 3.24 Інвазивна протокова карцинома грудної залози: альвеолярні структури в інфільтративному компоненті, виражений клітинний поліморфізм, гіперхромія ядер, численні мітози, гістологічно G3 ступінь злоякості (а). Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 400$; скануюча електронна мікроскопія, III варіант поверхневої конфігурації, групи пухлинних клітин з гладкими поверхнями без мікротрабекулярних цитоплазматичних виростів (b, c); Зб. (b) $\times 312$, (c) $\times 3284$; поодинокі пухлинні клітини з несиметричною поверхнею без мікрворсинок. Зб. (d) $\times 4000$.



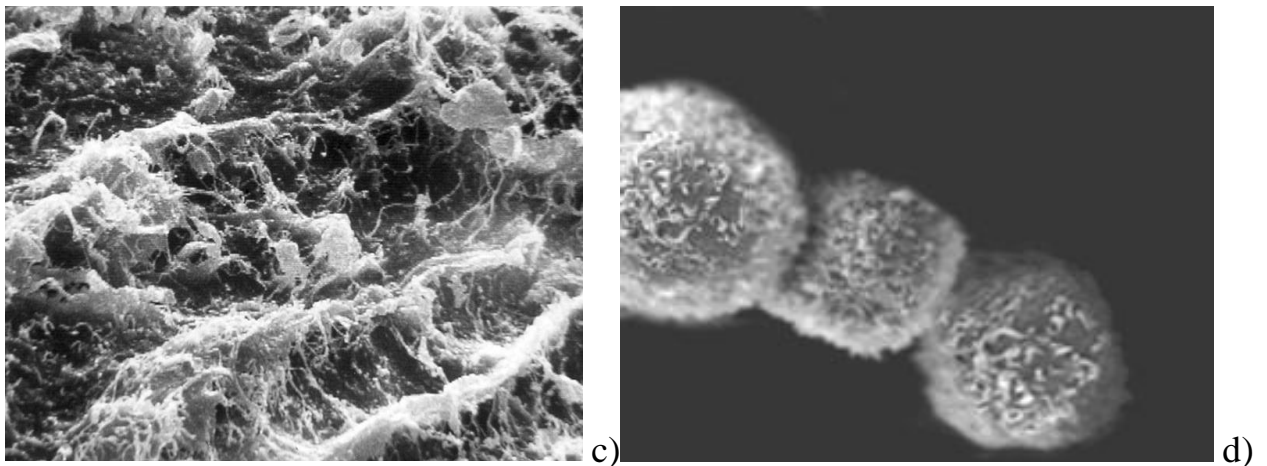


Рисунок 3.25 Інвазивна протокова карцинома грудної залози: трабекулярні (а) та дискретні (б) структури в інвазивному компоненті, виражений клітинний поліморфізм, гіперхромія ядер, численні мітотичні фігури, гістологічно G3 ступінь злоякості. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 400$; скануюча електронна мікроскопія, II варіант поверхневої конфігурації, пухлинні клітини з короткими мікротрабекулярними цитоплазматичними виростами (с); групи пухлинних клітин з рідкісними мікрворсинками. Зб. (с) $\times 1800$, (d) $\times 3500$.

Таким чином, проведені дослідження продемонструвало, що пухлинні клітини інвазивного протокового раку грудної залози, мають, в основному, три варіанти поверхневої конфігурації. Деякі клітини були повністю або частіше вогнищево покриті несиметричними мікрворсинками. На інших клітинах було мало несиметричних мікрворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні. У третьому варіанті пухлинні клітини не мали мікрворсинок. Перший варіант переважав за наявності тубулярних структур в інвазивному компоненті протокових карцином грудної залози. Другий варіант був характерний для солідного і трабекулярного компоненту інвазивних протокових карцином грудної залози. Третій варіант характеризувався наявністю переважно альвеолярних структур в інвазивному компоненті.

Порівняння конфігурації поверхні пухлинних клітин із гістологічно визначеним ступенем злоякості показало, що при G3 більшість клітин мали дуже мало або взагалі не мали мікрворсинок на своїх поверхнях. У пухлинах

зі ступенем диференціювання G1 більшість клітин мали на поверхні дифузно або вогнищево розподілені мікрворсинки. Це узгоджується з раніше опублікованими даними про наявність мікрворсинок на поверхнях клітин пухлини. Мікрворсинки рідко зустрічаються на поверхнях недиференційованого раку, на відміну від високодиференційованих, як, наприклад, при раку шлунка [233], раку підшлункової залози [234] та раку легені [235, 236]. Вони зменшуються за кількістю та розміром під час канцерогенезу [237]. Наявність мікрворсинок на обмеженій ділянці клітинної поверхні вказує на те, що полярність пухлинних клітин збережена, а отже, свідчить про краще збережену диференціацію пухлинних клітин. Орієнтація мікрворсинок, наявність яких була характерною для I і II варіантів поверхневої конфігурації пухлинних клітин, була різною, мікрворсинки могли бути вигнутими або косо орієнтованими до поверхні клітини, прямими і перпендикулярними до поверхні клітини, переважно асиметричними і дуже рідко однакової довжини.

Труднощі зі встановленням надійного прогнозу протокового РГЗ спричинили розробку гістопатологічних систем класифікації, які розподіляли рак грудної залози на 3-4 ступені злості [238, 239]. Ноттінгемська модифікація системи P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson відома як Ноттінгемська градууюча система, рекомендована різними професійними організаціями на міжнародному рівні (ВООЗ, AJCC, EU і Королівська Колегія Патологів), має велику перевагу серед інших гістопатологічних класифікацій [240]. Тим не менше, скануюча електронна мікроскопія, особливо в поєднанні з гістологічними та імуногістохімічними параметрами, є великою допомогою у дослідженні та діагностиці патологічних змін, що відбуваються на поверхнях тканини, і може сприяти прогностичній оцінці протокового РГЗ. Скануюча електронна мікроскопія дозволила встановити важливу роль цитоплазматичної мембрани в міжклітинних комунікаціях, рості та проліферації клітин, а наявність мікрворсинок на клітинній поверхні, які заповнені актиновими філаментами, чи їх відсутність, а також десмосоми, або

клітинні контакти, до складу яких входять кератинові мікрофіламенти, , що є гістохімічним маркером клітин епітелію, мають прогностичне значення щодо перебігу інвазивного протокового РГЗ. З точки зору поверхневої конфігурації пухлинних клітин нами виділено три їхніх варіанти. Перший варіант характеризувався наявністю у більшості пухлинних клітин численних асиметричних мікрворсинок з дифузним або вогнищевим їх розподілом на поверхні і достовірно переважав за наявності тубулярних структур в інфільтративному компоненті протокових карцином грудної залози всіх випадків ступеня градації G1 ($p < 0,05$ з G3). Другий варіант поверхневої конфігурації характеризувався малою кількістю асиметричних мікрворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні і діагностувався при солідному і трабекулярному інвазивному компоненту ступенів злоякісності G2 і G3 ($p > 0,05$). Третій варіант характеризувався відсутністю у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні і переважав в альвеолярних структурах інвазивного компоненту G2 і G3 ступенів ($p > 0,05$).

Встановлено, що зниження ступеня гістологічного диференціювання інвазивного протокового РГЗ асоційоване зі зменшенням або відсутністю асиметричних мікрворсинок на клітинній поверхні. Пухлини, класифіковані як G2, показали широкий спектр поверхневої конфігурації ракових клітин, а в 75% випадків карцином G3 характерною була відсутність у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні, тобто мав місце III варіант поверхневої конфігурації клітин.

Висновки до Розділу 3

Інфільтративна протокова карцинома грудної залози демонструє гетерогенність з точки зору морфологічної картини, гістоархітектоніки, ультраструктури, які асоційовані з молекулярним підтипом.

Детальне морфологічне дослідження інвазивного компонента протокового РГЗ дозволило виявити різні мікроскопічні структури та їх поєднання, такі як альвеолярні, солідні, трабекулярні, тубулярні та окремо

розташовані групи пухлинних клітин, характерні для того чи іншого молекулярного підтипу пухлини, з вираженим чи незначним гіалінозом строми, різним ступенем запальної інфільтрації строми.

За допомогою скануючої електронної мікроскопії нами виділено три варіанти поверхневої конфігурації пухлинних клітин. Встановлено, що зниження ступеня диференціювання (G) інвазивного протокового РГЗ асоційоване зі зменшенням або відсутністю асиметричних мікрворсинок на клітинній поверхні. Пухлини, класифіковані як G2, показали широкий спектр поверхневої конфігурації ракових клітин, а в 75% випадків карцином G3 характерною була відсутність у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні, тобто мав місце III варіант поверхневої конфігурації клітин.

Результати дослідження, викладені у Розділі 3, опубліковані в наступних наукових працях:

1. *Volos LI, Dudash AP.* Clinical and morphological features of luminal “A” subtype of invasive ductal breast cancer. *Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland).* 2020; 43(6): 293-306. DOI: <https://doi.org/10.23856/4338>

2. *Volos LI, Dudash AP.* Invasive ductal breast carcinoma: morphological features of molecular subtypes. The modern stage of the development of medical education in Ukraine and EU countries: Collective monograph Medical University of Lublin; Riga, Latvia: “Baltija Publishing”, 2021. P.50-66. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-090-2-3>

3. Волос Л.І., Дацюк Ю.Р., Дудаш А.П. Скануюча електронна мікроскопія інвазивного протокового раку грудної залози/ Scanning electron microscopy of invasive ductal breast cancer. *Lviv Medical Journal /Acta Medica Leopoliensia.* 2021; Vol. 27 No. 3–4: 9-25. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.009>

РОЗДІЛ 4

ЕКСПРЕСІЯ МАРКЕРІВ, ЩО ХАРАКТЕРИЗУЮТЬ ІНВАЗИВНІ ВЛАСТИВОСТІ ПРОТОВОКОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ, ЇХ ЗВ'ЯЗОК ІЗ МОРФОЛОГІЧНИМИ ПАРАМЕТРАМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНИМ ПІДТИПОМ ПУХЛИНИ

Зі збільшенням можливостей лікування в епоху прецизійної медицини традиційні клініко-патологічні прогностичні змінні і встановлені молекулярні прогностичні маркери виявилися недостатніми для відображення такого ступеня гетерогенності пухлини. Необхідні додаткові молекулярні маркери для персоналізованого підходу до терапії, а для її вдосконалення необхідні прогностичні біомаркери.

У зв'язку з цим, провідне місце в прогнозуванні пухлин займає молекулярна морфопатологія, яка враховує наявність чи відсутність онкогенів і супресорів пухлинного росту (молекулярно-біологічних маркерів) у клітинах. Відмінності в експресії таких маркерів, як епітеліальний кадгерин (Е-кадгерин), що відіграє важливу роль у процесі клітинної адгезії, є потужним супресором інвазії та метастазування, циклооксигеназа-2 (COX-2) і її важлива роль у пухлинній трансформації, проліферації клітин і неоваскуляризації, розподіл інфільтруючих пухлину лімфоцитів, щільність та інтенсивність їх експресії, зможуть пояснити, чому порівнювані за поширеністю і гістологічною структурою пухлини відрізняються за агресивністю перебігу захворювання.

Наявність інфільтруючих лімфоцитів в пухлині чи в перитуморальних ділянках було визнано важливим імунологічним біомаркером, який відображає протипухлинну імунну відповідь при РГЗ. Але прогностична цінність пухлино-інфільтруючих лімфоцитів при різних молекулярних підтипах інвазивного протокового РГЗ залишається недостатньо вивченою [241-245].

Важливим є також аналіз взаємозв'язку між експресією E-кадгерину, наявністю метастазів у лімфатичні вузли, клініко-патологічними ознаками та молекулярним підтипом інвазивного протокового РГЗ. Оцінка експресії E-кадгерину є важливим прогностичним чинником перебігу РГЗ. І будь-які зміни, пов'язані з аномалією експресії чи дисфункцією молекул клітинної адгезії, можуть призвести до серйозних деструктивних наслідків [246-248].

Попередні дані вказують на важливу роль COX-2 у пухлинній трансформації, проліферації клітин, неоваскуляризації і запаленні, тому оцінка експресії COX-2 є важливим прогностичним чинником перебігу різних молекулярних підтипів раку грудної залози, як і доцільність виділення COX-позитивних пухлин в окрему групу для оптимізації лікувальної тактики та використання можливостей таргетного контролю експресії ензиму [249, 250].

Використання імуногістохімічних маркерів ендотеліальних клітин є найбільш широко застосовуваним дослідженням процесів ангиогенезу, однак консенсус того, який кореляційний взаємозв'язок існує між внутрішньопухлинними судинами і молекулярним підтипом інфільтративного протокового раку грудної залози, вплив неоваскуляризації на перебіг захворювання, на загальну та безрецидивну виживаність пацієнтів, є до кінця не визначений, а дослідження, що порівнюють асоціації ангиогенезу і різних молекулярних підтипів РГЗ, є суперечливими [251, 252].

У даному розділі представлено результати імуногістохімічного аналізу експресії маркерів E-кадгерину, циклооксигенази COX-2, ендотеліальних клітин CD31, пухлино-інфільтруючих лімфоцитів CD3, CD20 і CD56, встановлення взаємозв'язків з клініко-патологічними ознаками і молекулярним підтипом інвазивного протокового раку грудної залози для подальшого визначення їх прогностичної цінності у розвитку та прогресуванні захворювання [253-266].

4.1 Особливості експресії адгезивних молекул E-кадгерину в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози

Епітеліальний кадгерин (E-кадгерин) – важливий член родини кадгеринів, відіграє головну роль у процесі клітинної адгезії, потужний супресор інвазії та метастазування. Однією з найважливіших особливостей процесу метастазування є деформація адгезивних контактів неопластичних клітин, опосередкована порушенням експресії кадгеринів. Іншою важливою особливістю процесу метастазування є реалізація епітеліально-мезенхімальної трансформації, яка забезпечує здатність пухлини до інвазії та метастазування. Вибіркова втрата E-кадгерину може спричинити дедиференціацію та інвазивність у карциномах людини, тому цей маркер розглядається як пухлинний супресор.

Нами проведене ІГХ дослідження та аналіз експресії E-кадгерину у 86 випадках інвазивного протокового раку грудної залози. За допомогою імуногістохімічного аналізу E-кадгерину було виявлено імунореактивність різного ступеня виразності залежно від віку пацієток, стадії захворювання, розміру пухлини, ступеня злоякісності G, ураження пухлинним процесом лімфатичних вузлів, а також у різних молекулярних підтипах карцином грудної залози.

E-кадгерин експресувався у вигляді мембранного забарвлення, що представлено на мікрофотографіях нижче. Експресія E-кадгерину оцінювалася як 0 (відсутність, рис. 4.1), 1 (неповне і слабке мембранне забарвлення, рис. 4.2), 2 (повне мембранне забарвлення зі слабкою або помірною інтенсивністю, рис. 4.3) та 3 (сильне забарвлення мембрани в >10% пухлинних клітин, рис. 4.4) на основі інтенсивності забарвлення мембрани епітеліальних клітин.

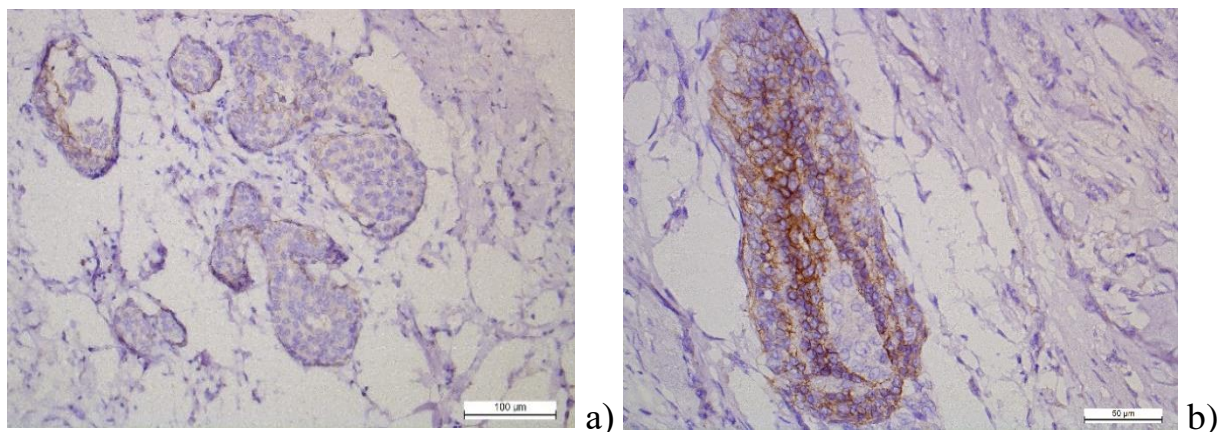


Рисунок 4.1 Інвазивна протокова карцинома грудної залози: а) без імунореактивності з антитілами до Е-кадгерину (Clone HECD-1). Зб. $\times 200$; б) позитивність мембрани в $<10\%$ пухлинних клітин (0 балів). Зб. $\times 400$.

Порівняння за експресією Е кадгерину та метастазами в лімфатичні вузли показало, що позитивна експресія Е-кадгерину була різного ступеня вираження і включала як низьку, так і високу експресію. Високий рівень експресії встановлено у 6 випадках (85,71 [52,74-99,97]%) із 7 неметастатичних пухлин, у 5 (55,56 [24,21-84,62]%) випадках з 9 з мікрометастазами у лімфатичні вузли і в 31 (44,29 [32,91-55,97]%) випадку з 70 з метастазами у лімфатичні вузли pN1-2.

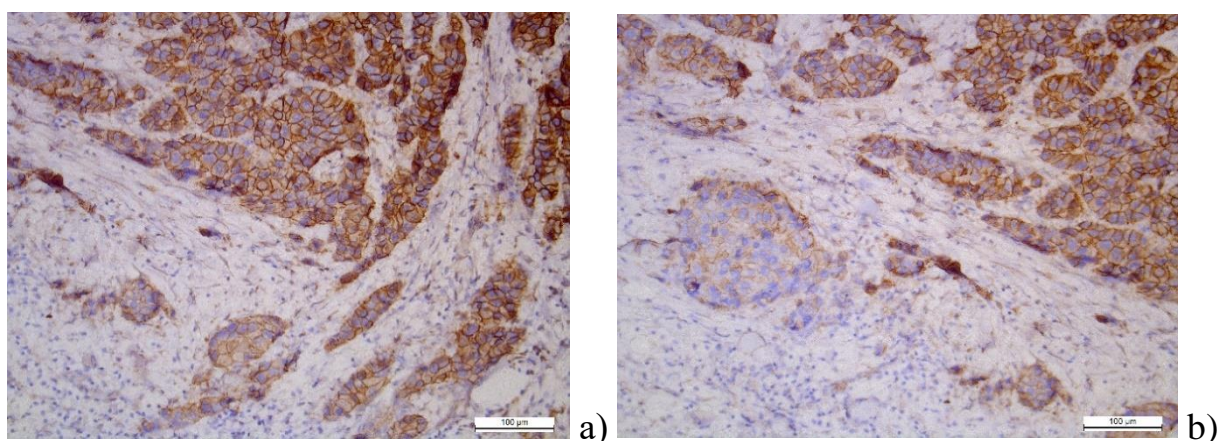


Рисунок 4.2 Інвазивна протокова карцинома грудної залози, експресія Е-кадгерину: неповне і слабке мембранне забарвлення $>10\%$ пухлинних клітин (1 бал). ПХТ (Clone HECD-1). Зб. $\times 200$.

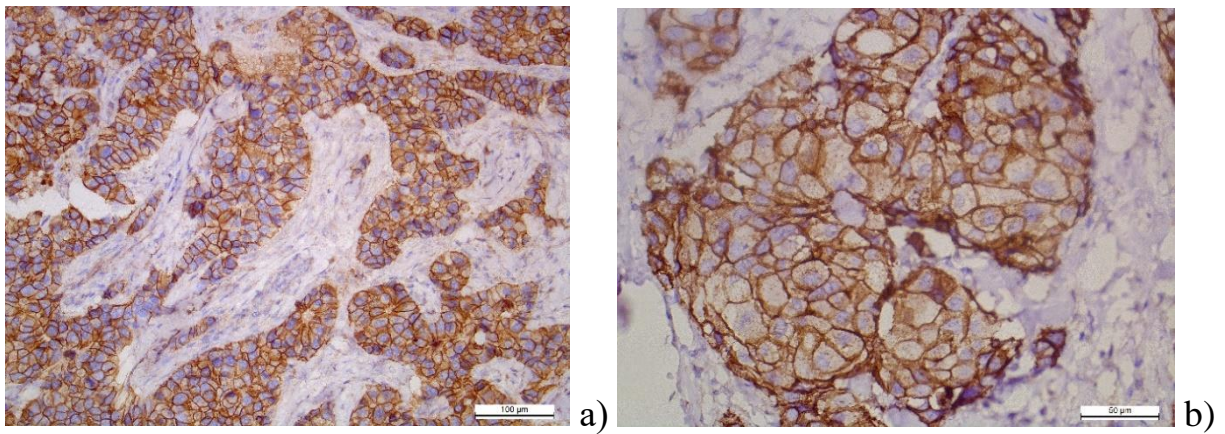


Рисунок 4.3 Інвазивна протокова карцинома грудної залози, експресія Е-кадгерину: повне мембранне забарвлення зі слабкою або помірною інтенсивністю у >10% пухлинних клітин (2 бали). ІГХТ (Clone HECD-1). Зб. а) - $\times 200$; б) - $\times 400$.

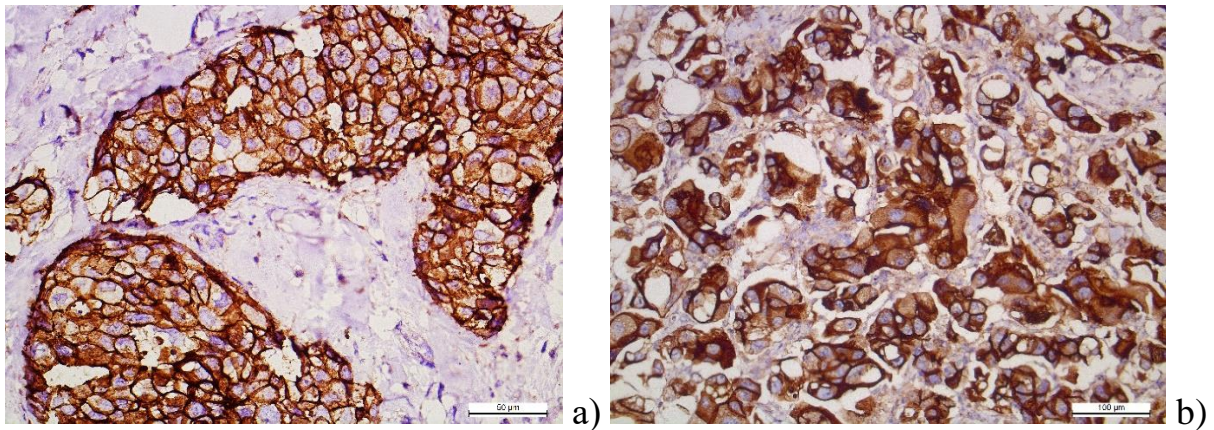


Рисунок 4.4 Інвазивна протокова карцинома грудної залози, експресія Е-кадгерину: сильне забарвлення мембрани в >10% пухлинних клітин (3 бали). ІГХТ (Clone HECD-1). Зб. а) - $\times 400$; б) - $\times 200$.

Натомість негативна або низька експресія Е-кадгерину виявлена в 1 (14,29 [0,03-47,26]%, $p=0,008$) спостереженні РГЗ без лімфогенного метастазування і в 4 (44,44 [15,38-75,79]%, $p=0,64$) випадках з наявними мікрометастазами. Низька і відсутня експресія Е-кадгерину переважала у 39 (55,71 [44,03-67,09]%, $p=0,18$) спостереженнях з пухлинним ураженням лімфатичних вузлів. Встановлено, що експресія Е-кадгерину в тканині протокового раку грудної залози значно нижча за наявності метастазів у лімфатичні вузли, ніж без метастатичного ураження лімфатичних вузлів ($\chi^2 =$

4,55, $p=0,031$; табл. 4.1), тобто низька експресія Е-кадгерину асоціювалася з метастазами в лімфатичні вузли. Окрім того, дана детальна характеристика експресії Е-кадгерину пухлинною тканиною в залежності від кількості уражених лімфатичних вузлів (від 1-3 л/в до 10 і більше л/в) (табл. 4.2). Досліджено експресію Е-кадгерину в порівнянні з клініко-патологічними ознаками (табл. 4.2) і молекулярними підтипами (табл. 4.3) інвазивної протокової карциноми грудної залози.

Експресія Е-кадгерину виявляла незначущі відмінності щодо віку пацієнок, тобто, чи були пацієнти в менопаузі чи пременопаузі (табл. 4.2). Так, у віці до 50 років негативна і низька експресія Е-кадгерину виявлялася у 21 випадку (53,85 [38,27-69,05] %), висока експресія (3 бали) – у 18 спостереженнях (46,15 [30,95-61,73]%) ($p>0,05$). Пацієнти у віці >50 років характеризувалися як високою позитивною експресією Е-кадгерину, так і низькою і негативною, однак не було суттєвих відмінностей в залежності від віку пацієнок.

Експресія Е-кадгерину виявляла значні відмінності щодо стадії pT1 і pT3 (класифікація TNM), тобто при розмірі пухлини ≤ 2 см і при розмірі ≥ 5 см. Так, у 28 хворих (32,56 [23,12-42,78] %) була встановлена стадія pT1, з них тільки у 9 спостереженнях (32,14 [16,45-50,26] %) визначалася негативна чи низька експресія, а відсоток пацієнтів з високою експресією Е-кадгерину був більшим, ніж у 2 рази і склав 67,86 [49,74-83,55] % (19 спостережень), $p=0,008$. Що стосується стадії pT3, то потрібно наголосити, що негативна і низька експресія виявлена у 77,78 [46,79-97,33] % випадків, в той час, як висока експресія Е-кадгерину виявлялася у 3,5 рази менше. Тобто, хворі зі стадією pT1 були значно асоційовані з позитивною експресією Е-кадгерину ($p=0,008$), а пацієнтки зі стадією pT3 були суттєво асоційовані з низькою і негативною експресією Е-кадгерину ($p=0,018$). Аналогічна картина спостерігалася при дослідженні експресії Е-кадгерину у пацієнок з 1 клінічною стадією (розмір пухлини в найбільшому діаметрі до 2 см N0, pN1mic) і 3 стадією (розмір пухлини в найбільшому діаметрі ≥ 5 см, N1-2, G2-3) захворювання (відповідно,

$p=0,016$ і $p=0,001$). Не виявлено суттєвих відмінностей щодо рівнів експресії E-кадгерину у стадії пухлини pT2 і 2 клінічній стадії (розмір пухлини в найбільшому діаметрі >2 см, <5 см, pN1a) ($p>0,05$).

Значущі результати порівняння спостерігалися між експресією E-кадгерину і ступенем диференціації G ($p=0,014$). У пацієнтів з помірно диференційованими (G2) і низько диференційованими (G3) пухлинами негативна і низька експресія E-кадгерину переважала в декілька разів випадки з високим рівнем експресії. Так, низькі показники клітинної адгезії визначалися у 37 пацієнтів з G2 пухлинами, що склало 64,91 [52,16-76,66] %. Висока позитивна експресія E-кадгерину виявлена у 20 пацієток (35,09 [23,34-47,84] %), тобто G2 пухлини достовірно характеризувалися переважанням негативної і низької експресії E-кадгерину ($p=0,001$). G3 пухлини аналогічно проявлялися негативною і низькою експресією у 16 випадках (76,19 [56,16-91,50] %), що було у 3,2 раза більше за G3 пухлини з високим ступенем експресії E-кадгерину (5 спостережень, або 23,81 [8,50-43,84] %), ($p=0,001$).

Однак не було суттєвих відмінностей у G1 карцином ($p=0,109$). Із 7 (8,14 [3,33-14,81] %) випадків інвазивної протокової карциноми G1 ступеня диференціації E-кадгерин був відсутнім чи слабо позитивним у 2 пацієнтів (28,57 [3,70-64,68] %), проте у 5 пацієнтів (71,43 [35,32-96,30] %) виявлена висока його експресія.

Детальне дослідження експресії E-кадгерину пухлинною тканиною в залежності від кількості уражених лімфатичних вузлів (від 1-3 л/в до 10 і більше л/в) не виявило достовірних відмінностей між ступенем експресії і кількістю уражених пухлиною лімфовузлів, відповідно ($p>0,05$), хоча спостереження з позитивним статусом лімфатичних вузлів мали тенденцію до частіше негативної і низької експресії E-кадгерину (0-2 бали).

Встановлено, що низька експресія E-кадгерину або її відсутність виявлялася в пухлинах pT3 (≥ 5 см), у пацієток з 3 клінічною стадією (≥ 5 см, N2, G2-3), з G2 і G3 ступенем злоякісності. Натомість високий рівень експресії

Е-кадгерину мав місце у пацієток зі стадією pT1 (≤ 2 см), 1 клінічною стадією пухлинного процесу (до 2 см N0, pN1mic), відсутністю метастазів у лімфатичних вузлах (pN0). Однак не було суттєвих відмінностей щодо віку пацієток ($p > 0,05$).

Вивчено асоціацію експресії Е-кадгерину з рецепторним статусом пухлин і молекулярно-генетичним підтипом карцином (табл. 4.3).

Висока експресія Е-кадгерину була поширеною в ER-позитивних пухлинах, зокрема у 16 (64,00 [44,60-81,28] %, $p = 0,048$) хворих з 25 з люмінальним А підтипом карциноми. Потрібно наголосити, що висока експресія Е-кадгерину визначалася у пацієток як пременопаузального, так і постменопаузального віку, проте пацієтки у віці > 50 років були значно асоційовані з позитивною експресією Е-кадгерину.

У пацієток з люмінальним В раком грудної залози дослідження Е-кадгерину продемонструвало низьку і негативну експресію у 12 спостереженнях (54,55 [33,95-74,36] %) і в 10 випадках 45,45 [25,64-66,05] %) – високий рівень. У вікових групах до 50 років і більше 50 незначно переважала низька і негативна експресія ($p > 0,05$). Аналогічна картина прослідковувалася у групі пацієток з Her2/neu-позитивним підтипом. Так, в 11 (57,89 [35,65-78,57] %) з 19 хворих виявлено негативну і низьку експресію, у 8 (42,11 [21,43-64,35] %) спостерігалася позитивна висока експресія.

Таблиця 4.1

Порівняння за експресією E кадгерину та метастазами в лімфатичні вузли

Метастази в лімфатичні вузли	Кількість пацієнтів (%)						p (χ^2)
	Загальна кількість (n=86)		Негативна або низька експресія E-кадгерину (0–2 бали)		Висока експресія E-кадгерину (3 бали)		
	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	
pN0 (відсутні)	7	8,14 [3,33-14,81]	1	14,29 [0,03-47,26]	6	85,71 [52,74-99,97]	0,008
pN1mic (мікро)	9	10,47 [4,92-17,77]	4	44,44 [15,38-75,79]	5	55,56 [24,21-84,62]	0,637
pN1-2	70	81,40 [72,53-88,86]	39	55,71 [44,03-67,09]	31	44,29 [32,91-55,97]	0,176
<i>Загальний p (χ^2)</i>							0,031

Примітка: Метастази в лімфатичних вузлах відносяться до пахвових лімфатичних вузлів і сторожових лімфатичних вузлів і включають як мікрометастази лімфатичних вузлів, так і наявні пухлинні метастатичні ураження

Таблиця 4.2

Порівняння за експресією Е-кадгерину клінічних та патологічних ознак
інвазивної протокової карциноми грудної залози

Клініко-патологічні ознаки	Кількість пацієнтів (%)						p (χ^2)
	Загальна кількість		Негативна або низька експресія Е-кадгерину (0–2 бали)		Висока експресія Е-кадгерину (3 бали)		
	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	
Вік:	86	100,00	46	53,49 [42,95-63,87]	40	46,51 [36,13-57,05]	0,360
<50	39	45,35 [35,01-55,90]	21	53,85 [38,27-69,05]	18	46,15 [30,95-61,73]	0,497
>50	47	54,65 [44,10-64,99]	25	53,19 [38,99-67,13]	22	46,81 [32,87-61,01]	0,536
Стадія pT:	86	100,00	41	47,67 [37,25-58,20]	45	52,33 [41,80-62,75]	0,542
pT1 (≤ 2 см)	28	32,56 [23,12-42,78]	9	32,14 [16,45-50,26]	19	67,86 [49,74-83,55]	0,008
pT2 (>2 см, <5см)	42	48,84 [38,38-59,35]	20	47,62 [32,85-62,60]	22	52,38 [37,40-67,15]	0,663
pT3 (≥ 5 см)	9	10,47 [4,92-17,77]	7	77,78 [46,79-97,33]	2	22,22 [2,67-53,21]	0,018
pT4 (≥ 5 см, клінічні особливості)	7	8,14 [3,33-14,81]	5	71,43 [35,32-96,30]	2	28,57 [3,70-64,68]	0,109
Лімфатичні вузли:	86	100,00	44	51,16 [40,65-61,62]	42	48,84 [38,38-59,35]	0,760
pN0	7	8,14 [3,33-14,81]	1	14,29 [0,03-47,26]	6	85,71 [52,74-99,97]	0,008
pN1міс (мікро)	9	10,47 [4,92-17,77]	4	44,44 [15,38-75,79]	5	55,56 [24,21-84,62]	0,637
(1-3 л/в)	41	47,67 [37,25-58,20]	22	53,66 [38,46-68,52]	19	46,34 [31,48-61,54]	0,508
(4-9 л/в)	18	20,93 [13,04-30,11]	10	55,56 [32,83-77,12]	8	44,44 [22,88-67,17]	0,505
(≥ 10 л/в)	11	12,79 [6,61-20,63]	7	63,64 [34,52-88,13]	4	36,36 [11,87-65,48]	0,201

продовження табл. 4.2

Стадія клінічна:	<u>86</u>	<u>100,00</u>	45	52,33 [41,80-62,75]	41	47,67 [37,25-58,20]	0,542
1 (до 2 см N0, pN1mic)	17	19,77 [12,09-28,79]	5	29,41 [10,84-52,55]	12	70,59 [47,45-89,16]	0,016
2 (>2 см, <5см, pN1a)	40	46,51 [36,13-57,05]	19	47,50 [32,39-62,85]	21	52,50 [37,15-67,61]	0,655
3 (≥5 см, N2, G2-3)	29	33,72 [24,17-44,00]	21	72,41 [55,04-86,86]	8	27,59 [13,14-44,96]	0,001
Ступінь злоякісності (G):	<u>86</u>	<u>100,00</u>	56	65,12 [54,78-74,78]	40	46,51 [36,13-57,05]	0,014
G1	7	8,14 [3,33-14,81]	2	28,57 [3,70-64,68]	5	71,43 [35,32-96,30]	0,109
G2	57	66,28 [56,00-75,83]	37	64,91 [52,16-76,66]	20	35,09 [23,34-47,84]	0,001
G3	21	24,42 [15,98-34,00]	16	76,19 [56,16-91,50]	5	23,81 [8,50-43,84]	0,001
G4	1	1,16 [0-4,50]	1	100,00	0	0,00	0,157

Примітка: Частка «Загальна кількість» обрахована від усіх досліджуваних пацієнтів (n=86)

Таблиця 4.3

Порівняння за експресією Е-кадгерину молекулярних підтипів інвазивної протокової карциноми грудної залози

Молекулярний підтип	Кількість пацієнтів (%)						p (χ^2)
	Загальна кількість (100%)		негативна або низька експресія Е-кадгерину (0–2 бали)		Висока експресія Е-кадгерину (3 бали)		
	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	
Молекулярні підтипи:	86	100	46	53,49 [42,95-63,87]	40	46,51 [36,13-57,05]	0,360
Вік:							
<50	39	45,35 [35,01-55,90]	21	53,85 [38,27-69,05]	18	46,15 [30,95-61,73]	0,497
>50	47	54,65 [44,1-64,99]	25	53,19 [38,99-67,13]	22	46,81 [32,87-61,01]	0,536
Люмінальний А (ER+, PR+, Her-2/neu-)	25	29,07 [20,01-39,06]	9	36,00 [18,72-55,40]	16	64,00 [44,60-81,28]	0,048
Вік:							
<50	8	32,00 [15,54-51,19]	3	37,50 [9,46-71,31]	5	62,50 [28,69-90,54]	0,317
>50	17	68,00 [48,81-84,46]	6	35,29 [15,05-58,80]	11	64,71 [41,20-84,95]	0,086
Люмінальний В ER+, PR+, Her-2/neu+ або ER+, PR+, Her-2/neu-, Ki-67 \geq 20%	22	25,58 [16,97-35,28]	12	54,55 [33,95-74,36]	10	45,45 [25,64-66,05]	0,546
Вік:							
<50	13	59,09 [38,36-78,26]	7	53,85 [27,51-79,08]	6	46,15 [20,92-72,49]	0,695
>50	9	40,91 [21,74-61,64]	5	55,56 [24,21-84,62]	4	44,44 [15,38-75,79]	0,637

продовження табл. 4.3

Her2/neu+ ER-, PR-, Her-2/neu+	19	22,09 [14,01-31,42]	11	57,89 [35,65-78,57]	8	42,11 [21,43-64,35]	0,330
Вік:							
<50	11	57,89 [35,65-78,57]	6	54,55 [26,03-81,52]	5	45,45 [18,48-73,97]	0,670
>50	8	42,11 [21,43-64,35]	5	62,50 [28,69-90,54]	3	37,50 [9,46-71,31]	0,317
Потрійно-негативний ER-, PR-, Her-2/neu-	20	23,26 [14,99-32,71]	14	70,00 [48,66-87,56]	6	30,00 [12,44-51,34]	0,011
Вік:							
<50	7	35,00 [16,18-56,66]	5	71,43 [35,32-96,30]	2	28,57 [3,70-64,68]	0,109
>50	13	65,00 [43,34-83,82]	9	69,23 [42,59-90,33]	4	30,77 [9,67-57,41]	0,050

Примітка: Частка «Загальна кількість» обрахована від усіх досліджуваних пацієнтів (n=86)

Також переважала низька і негативна експресія незалежно від того, чи були пацієнти в менопаузі, чи пременопаузі, і не було суттєвих відмінностей з підгрупою, в якій спостерігалася позитивна висока експресія ($p > 0,05$).

Що стосується потрійно-негативного раку грудної залози, необхідно зазначити, що було виявлено достовірне переважання пацієток з низькою і негативною експресією E-кадгерину ($p = 0,011$). У 14 (70,00 [48,66-87,56] %) з 20 спостереженнях визначалися низькі показники клітинної адгезії, хоча більшість хворих була у віці понад 50 років ($p = 0,050$). У 30% пацієнтів спостерігалася висока експресія E-кадгерину, у тій же віковій групі.

Для встановлення кореляційних зв'язків між прогностичними характеристиками різних молекулярних підтипів протокового раку грудної залози і експресією E-кадгерину, а також кореляційних зв'язків всередині кожного молекулярного підтипу нами проведені статистичні дослідження. Для оцінки взаємозв'язку і впливу ознак використовували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена (R), методи лінійної і логістичної регресії.

Кореляційні зв'язки між низькою експресією E-кадгерину та прогностичними параметрами інфільтративного протокового РГЗ продемонстрували наступне: виявлено достовірний прямий помірний кореляційний зв'язок з N ($r = +0,61$; $p = 0,00005$), з N2 ($r = +0,55$; $p = 0,0001$), з G ($r = +0,33$; $p = 0,002$), з низьким ступенем диференціації G3 ($r = +0,26$; $p = 0,016$). Високий рівень експресії E-кадгерину достовірно корелював з відсутністю метастатичного ураження лімфатичних вузлів N0 ($r = +0,48$; $p = 0,00002$), з високим ступенем диференціації G1 ($r = +0,23$; $p = 0,03$), однак встановлено зворотний помірний кореляційний зв'язок з N2 ($r = -0,55$; $p = 0,0001$), з низьким ступенем диференціації пухлини G3 ($r = -0,26$; $p = 0,016$).

Нами також встановлені кореляційні зв'язки між експресією E-кадгерину та прогностичними параметрами всередині кожного молекулярного підтипу. У випадках протокового раку люмінального A підтипу було встановлено пряму помірну кореляцію між низькою експресією E-кадгерину та N ($r = +0,66$; $p = 0,0003$), N2 ($r = +0,58$; $p = 0,002$), G ($r = +0,49$; $p = 0,01$) та G3 ($r =$

+0,39; $p=0,05$). В той же час, встановлено зворотний помірний кореляційний зв'язок з N0 ($r= -0,51$; $p=0,008$) та з G1 ($r= -0,38$; $p=0,06$), хоча з G1 кореляція була $p>0,05$). Висока експресія E-кадгерину достовірно корелювала з N0 ($r= +0,51$; $p=0,01$) та G1 ($r= +0,38$; $p=0,06$), зворотний помірний кореляційний зв'язок нами встановлено з N2 ($r= -0,58$; $p=0,002$) та G3 ($r= -0,39$; $p=0,05$).

У групі пацієнтів з люмінальним В молекулярним підтипом протокового раку низька експресія E-кадгерину демонструвала достовірний високий прямий кореляційний зв'язок з N ($r= +0,75$; $p=0,0003$), N2 ($r= +0,76$; $p=0,0005$), а високий рівень експресії E-кадгерину помірно корелював з N0 ($r= +0,44$; $p=0,005$) та N1 ($r= +0,45$; $p=0,004$).

При визначенні кореляційних зв'язків у потрійному негативному молекулярному підтипі PГЗ було встановлено пряму кореляцію між низькою експресією E-кадгерину та G ($r= +0,53$; $p=0,02$) і G3 ступенем диференціації пухлини ($r= +0,48$; $p=0,03$). Висока експресія E-кадгерину достовірно корелювала з G2 ступенем диференціації пухлини ($r= +0,53$; $p=0,02$). Кореляційний зв'язок з T1 ($r= +0,21$) та N0 ($r= +0,36$) був прямим низьким і помірним, але не достовірним ($p>0,05$).

У групі пацієнтів з Her-2/neu молекулярним підтипом протокового раку низька експресія E-кадгерину демонструвала достовірний високий прямий кореляційний зв'язок з N ($r= +0,75$; $p=0,0002$), N2 ($r= +0,60$; $p=0,01$), а прямий кореляційний зв'язок з T ($r= +0,33$) та T3 ($r= +0,29$) був помірним та низьким і не достовірним ($p>0,05$). Високий рівень експресії E-кадгерину демонстрував достовірний високий прямий кореляційний зв'язок з N0 ($r= +0,80$; $p=0,00004$), а з T1 кореляція була слабкою і недостовірною ($r= +0,30$; $p>0,05$).

Таким чином, результати проведеного дослідження дозволили проаналізувати імунореактивність E-кадгерину в порівняльному аспекті залежно від віку пацієнток, стадії захворювання, розміру пухлини, ступеня злоякісності G, ураження пухлинним процесом лімфатичних вузлів, а також у різних молекулярних підтипах карцином грудної залози, встановити кореляційні зв'язки між експресією E-кадгерину та прогностичними

характеристиками різних молекулярних підтипів протокового раку грудної залози з використанням коефіцієнту рангової кореляції Спірмена.

У розділі 5 нами буде представлено кореляційний аналіз між експресією маркерів, що характеризують інвазивні властивості протокового раку грудної залози, включаючи E-кадгерин, COX-2, CD31, лімфоїдну запальну інфільтрацію, їх зв'язок із морфологічними параметрами та молекулярним підтипом пухлини.

4.2 Експресія COX-2 в асоціації з клініко-патологічними параметрами та підтипами інвазивного протокового раку грудної залози

Експресія COX-2 є патологічною та індукується різними стимулюючими чинниками, фермент відіграє значну роль у проліферації клітин. Експресія COX-2 пов'язана з неоваскуляризацією, пригніченням апоптозу, стимуляцією росту клітин та пригніченням імунітету. Рівень експресії COX-2 є важливим прогностичним чинником перебігу різних молекулярних підтипів раку грудної залози.

Імуногістохімічне дослідження експресії COX-2 нами проведене у 86 спостереженнях інвазивного протокового раку грудної залози. За допомогою імуногістохімічного аналізу COX-2 було виявлено імунореактивність різного ступеня виразності залежно від віку пацієнток, стадії захворювання, розміру пухлини, ступеня злоякісності G, ураження пухлинним процесом лімфатичних вузлів, а також у різних молекулярних підтипах карцином грудної залози.

COX-2 експресувалася у вигляді цитоплазматичної зернистості, яка була особливо помітною в перинуклеарній області пухлинних клітин. Експресія COX-2 оцінювалася як 0 (відсутня, рис. 4.5), 1 (слабка, рис. 4.6), 2 (помірна, рис. 4.7) та 3 (сильна, рис. 4.8) на основі інтенсивності фарбування епітеліальних клітин. Надекспресія COX-2 встановлювалася на значенні імунореактивного показника, що дорівнював або був вищий від граничного показника 6.

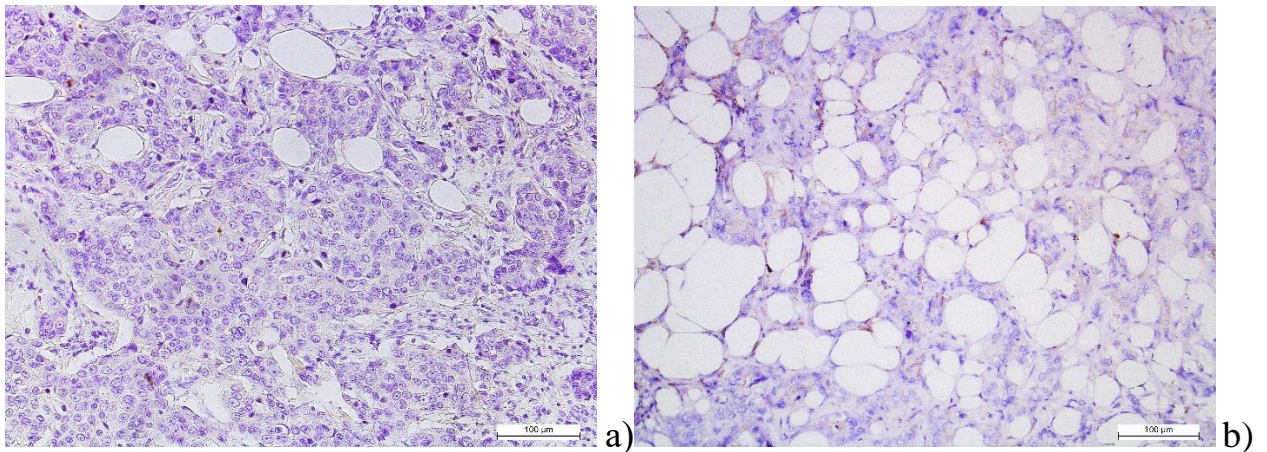


Рисунок 4.5 Інвазивна протокова карцинома грудної залози без імунореактивності (0 балів) з антитілами до СОХ-2 (Clone SP21). 3б.×200.

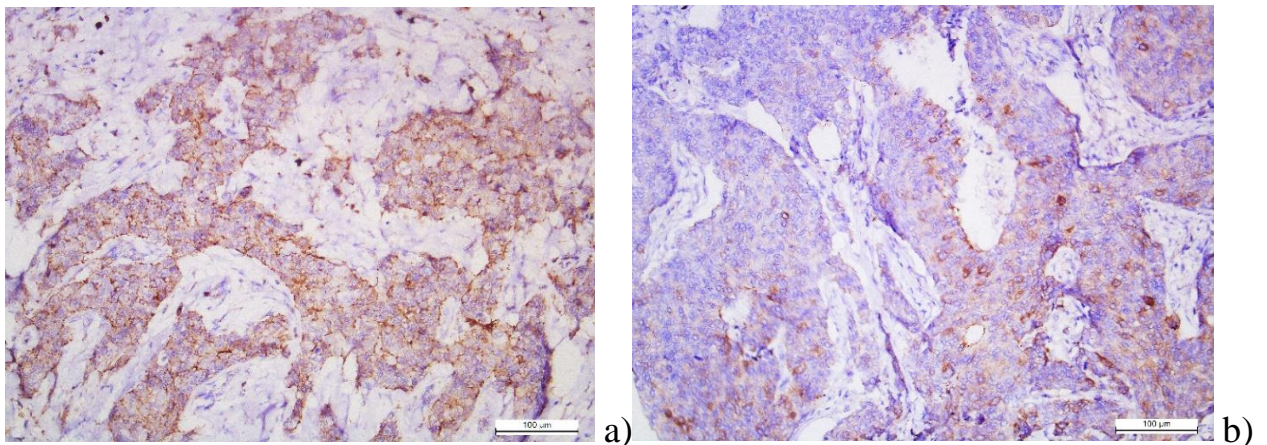


Рисунок 4.6 Імуногістохімічно слабка за інтенсивністю (1 бал) експресія СОХ-2 в інвазивній протоковій карциномі грудної залози. Імунореактивний показник менше 6 у.о. ІГХТ до СОХ-2 (Clone SP21). 3б ×200.

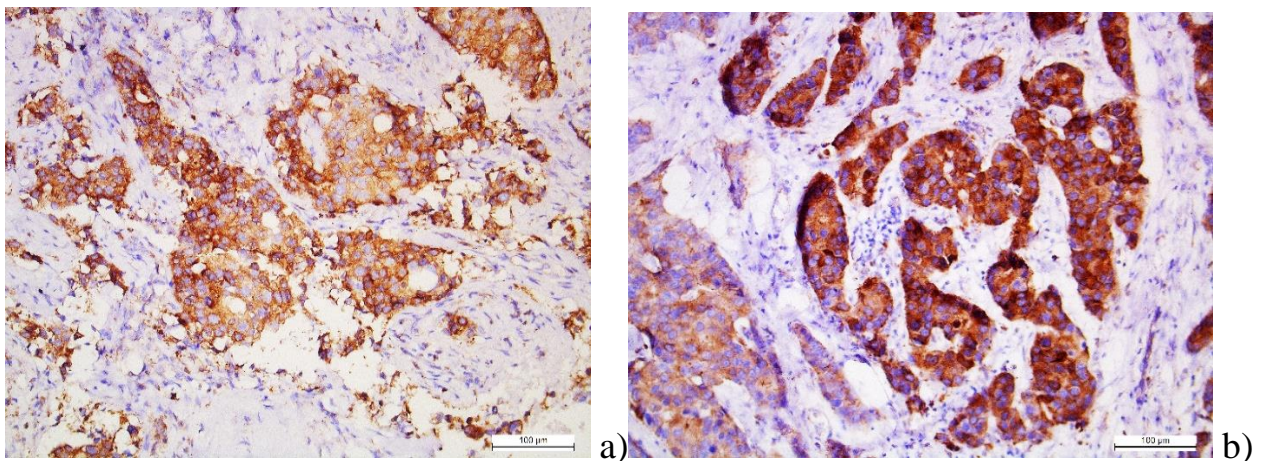


Рисунок 4.7 Імуногістохімічно помірна за інтенсивністю (2 бали) експресія СОХ-2. Імунореактивний показник дорівнює 6 у.о. ІГХТ до СОХ-2 (Clone SP21). 3б ×200.

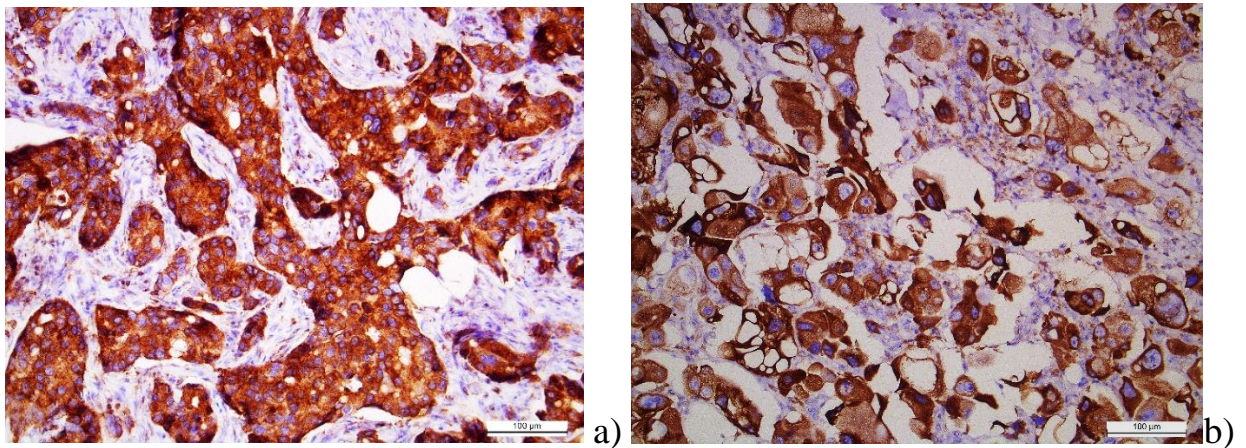


Рисунок 4.8 Імуногістохімічно сильна за інтенсивністю (3 бали) експресія COX-2. Імунореактивний показник 9-12 у.о. ІГХТ до COX-2 (Clone SP21). 36×200 .

Непухлинна тканина в безпосередній близькості до новоутворення дуже рідко експресувала COX-2 в часточках, протоках, кровоносних судинах та стромальних клітинах, до того ж інтенсивність забарвлення була дуже слабкою. Нормальна тканина віддалена від пухлини не експресувала COX-2 за результатами дослідження.

Результати порівняння за експресією COX-2 клініко-патологічних характеристик, включаючи вік пацієнтів, стадію захворювання, розмір пухлини, ступінь злоякісності, статус лімфатичних вузлів, узагальнено в таблиці 4.4.

Таблиця 4.4

Порівняння за експресією СОХ-2 клінічних та патологічних ознак
інвазивної протокової карциноми грудної залози

Клініко-патологічні ознаки	Кількість пацієнтів (%)						p (χ^2)
	Загальна кількість		СОХ-2 негативна або слабка експресія (0–6 у.о.)		СОХ-2 надекспресія (7–12 у.о.)		
	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	
Вік:	86	100,00	40	46,51 [36,13-57,05]	46	53,49 [42,95-63,87]	0,360
<50	39	45,35 [35,01-55,90]	12	30,77 [17,46-45,96]	27	69,23 [54,04-82,54]	0,001
>50	47	54,65 [44,10-64,99]	28	59,57 [45,35-73,03]	19	40,43 [26,97-54,65]	0,063
Стадія pT:	86	100,00	35	40,70 [30,60-51,21]	51	59,30 [48,79-69,40]	0,015
pT1 (≤ 2 см)	28	32,56 [23,12-42,78]	21	75,00 [57,63-88,98]	7	25,00 [11,02-42,37]	<0,001
pT2 (> 2 см, < 5 см)	42	48,84 [38,38-59,35]	11	26,19 [14,18-40,37]	31	73,81 [59,63-85,82]	<0,001
pT3 (≥ 5 см)	9	10,47 [4,92-17,77]	2	22,22 [2,67-53,21]	7	77,78 [46,79-97,33]	0,018
pT4 (≥ 5 см, клінічні особливості)	7	8,14 [3,33-14,81]	1	14,29 [0,03-47,26]	6	85,71 [52,74-99,97]	0,008
Лімфатичні вузли:	86	100,00	41	47,67 [37,25-58,2]	45	52,33 [41,80-62,75]	0,542
pN0	7	8,14 [3,33-14,81]	5	71,43 [35,32-96,30]	2	28,57 [3,70-64,68]	0,109
pN1міс (мікро)	9	10,47 [4,92-17,77]	5	55,56 [24,21-84,62]	4	44,44 [15,38-75,79]	0,637
(1-3 л/в)	41	47,67 [37,25-58,20]	19	46,34 [31,48-61,54]	22	53,66 [38,46-68,52]	0,508
(4-9 л/в)	18	20,93 [13,04-30,11]	8	44,44 [22,88-67,17]	10	55,66 [32,83-77,12]	0,505
(≥ 10 л/в)	11	12,79 [6,61-20,63]	4	36,36 [11,87-65,48]	7	63,64 [34,52-88,13]	0,201

продовження табл. 4.4

Стадія клінічна:	86	100,00	30	34,88 [25,22-45,22]	56	65,12 [54,78-74,78]	<0,001
1 (до 2 см N0, pN1mic)	17	19,77 [12,09-28,79]	14	82,35 [61,32-96,21]	3	17,65 [3,79-38,68]	<0,001
2 (>2 см, <5см, pN1a)	40	46,51 [36,13-57,05]	10	25,00 [12,99-39,40]	30	75,00 [60,60-87,01]	<0,001
3 (≥5 см, N2, G2-3)	29	33,72 [24,17-44,00]	6	20,69 [8,19-37,03]	23	79,31 [62,97-91,81]	<0,001
Ступінь злоякісності (G):	86	100,00	25	29,07 [20,01-39,06]	61	70,93 [60,94-79,99]	<0,001
G1	7	8,14 [3,33-14,81]	6	85,71 [52,74-99,97]	1	14,29 [0,03-47,26]	0,008
G2	57	66,28 [56,00-75,83]	15	26,32 [15,81-38,41]	42	73,68 [61,59-84,19]	<0,001
G3	21	24,42 [15,98-34,00]	4	19,05 [5,55-38,12]	17	80,95 [61,88-94,45]	<0,001
G4	1	1,16 [0-4,50]	0	0,00	1	100,00	0,157

Примітка: Частка «Загальна кількість» обрахована від усіх досліджуваних пацієнтів (n=86)

Надмірна експресія СОХ-2 спостерігалася загалом у 46 (53,49 [42,95-63,87] %) спостереженнях інвазивних протокових карцином і переважала в пацієнтів у віці до 50 років – 27 (69,23 [54,04-82,54] %), хоча хворих у віковій категорії до 50 років загалом було менше, ніж у постменопаузі і склало 39 (45,35 [35,01-55,90] %) пацієток. Негативна реакція і слабка експресія СОХ-2 виявлена відповідно у 40 (46,51 [36,13-57,05] %) випадків, причому у віці до 50 років відсоток пацієнтів був меншим практично у 2 рази (30,77 [17,46-45,96] %), ніж у постменопаузі (59,57 [45,35-73,03] %), тобто слабкий ступінь експресії СОХ-2 переважав у віці після 50 років ($p=0,008$).

Експресія СОХ-2 значно була відмінна залежно від розміру пухлини: надмірна експресія СОХ-2 була виявлена у 44 випадках (86,27 [75,59-94,24] %) ($n=31+7+6$) пухлин, розмір яких >2 см у найбільшому вимірі, порівняно з 7 спостереженнями (13,73 [5,76-24,41] %) пухлин розміром ≤ 2 см ($p<0,001$), притому, що відсутність СОХ-2 чи слабка експресія саме переважала при стадії pT1 з розмірами пухлини ≤ 2 см - 21 (75,00 [57,63-88,98] %) випадків.

Експресія СОХ-2 також значно залежала від наявності метастазів у лімфатичних вузлах: лише 2 (28,57 [3,70-64,68] %) випадки первинних пухлин без метастазів у лімфатичних вузлах (pN0) демонстрували надмірну експресію СОХ-2, тоді як випадки з позитивним статусом лімфатичних вузлів мали тенденцію до частішої надмірної експресії СОХ-2. Метастатичне ураження лімфатичних вузлів демонструвало підвищення надмірної експресії СОХ-2 відповідно у 53,66 [38,46-68,52] % при ураженні 1-3 л/в; 55,66 [32,83-77,12] % – 4-9 л/в і 63,64 [34,52-88,13] % – ≥ 10 л/в у пацієнтів ($p>0,05$).

Аналогічно досліджено експресію СОХ-2 при різних клінічних стадіях. Надмірна експресія СОХ-2 була виявлена тільки у 17,65 [3,79-38,68] % пацієнтів з 1 клінічною стадією, в той час, пацієнтів з 2 і 3 клінічними стадіями і надекспресією СОХ-2 було вже в понад 4 рази більше, ніж з 1 клінічною стадією, і склало 75,00 [60,60-87,01] % і 79,31 [62,97-91,81] % відповідно ($p<0,001$).

Інші значущі результати порівняння спостерігалися між експресією COX-2 і ступенем диференціації G. Із 7 (8,14 [3,33-14,81] %) випадків інвазивної протокової карциноми G1 ступеня диференціації COX-2 був відсутнім чи слабо позитивним у 6 пацієнтів (85,71 [52,74-99,97] %), і тільки в 1 випадку (14,29 [0,03-47,26] %) демонстрував надекспресію ($p=0,008$). У пацієнтів з помірно диференційованими (G2) і низько диференційованими (G3) різко зростає ступінь інтенсивності експресії одночасно з великим відсотком імунопозитивних клітин. Надмірна експресія COX-2 визначалася у 73,68 [61,59-84,19] % пацієнтів з G2 пухлинами й у 80,95 [61,88-94,45] % хворих з G3 пухлинами ($p<0,001$).

Нами також вивчено асоціацію експресії COX-2 з рецепторним статусом пухлин і молекулярно-генетичним підтипом карцином. Результати представлено в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5

Порівняння за експресією СОХ-2 молекулярних підтипів
інвазивної протокової карциноми грудної залози

Молекулярний підтип	Кількість пацієнтів (%)						p (χ^2)
	Загальна кількість (100%)		СОХ-2 негативна або слабка експресія (0–6 у.о.)		СОХ-2 надекспресія (7–12 у.о.)		
	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	абс. дані	% [ДІ 95%]	
Молекулярні підтипи:	86	100	40	46,51 [36,13-57,05]	46	53,49 [42,95-63,87]	0,360
Вік:							
<50	39	45,35 [35,01-55,90]	12	30,77 [17,46-45,96]	27	69,23 [54,04-82,54]	0,001
>50	47	54,65 [44,1-64,99]	28	59,57 [45,35-73,03]	19	40,43 [26,97-54,65]	0,063
Люмінальний А (ER+, PR+, Her-2/neu-)	25	29,07 [20,01-39,06]	20	80,00 [62,44-93,01]	5	20,00 [6,99-37,56]	<0,001
Вік:							
<50	8	32,00 [15,54-51,19]	5	62,50 [28,69-90,54]	3	37,50 [9,46-71,31]	0,317
>50	17	68,00 [48,81-84,46]	15	88,24 [69,25-98,74]	2	11,76 [1,26-30,75]	<0,001
Люмінальний В ER+, PR+, Her-2/neu+ або ER+, PR+, Her-2/neu-, Ki-67 \geq 20%	22	25,58 [16,97-35,28]	10	45,45 [25,64-66,05]	12	54,55 [33,95-74,36]	0,546
Вік:							
<50	13	59,09 [38,36-78,26]	3	23,08 [5,17-48,75]	10	76,92 [51,25-94,83]	0,006
>50	9	40,91 [21,74-61,64]	7	77,78 [46,79-97,33]	2	22,22 [2,67-53,21]	0,018

продовження табл. 4.5

Her2/neu+ ER-, PR-, Her-2/neu+	19	22,09 [14,01-31,42]	5	26,32 [9,53-47,81]	14	73,68 [52,19-90,47]	0,004
Вік:							
<50	11	57,89 [35,65-78,57]	2	18,18 [2,09-45,07]	9	81,82 [54,93-97,91]	0,003
>50	8	42,11 [21,43-64,35]	3	37,50 [9,46-71,31]	5	62,50 [28,69-90,54]	0,317
Потрійно-негативний ER-, PR-, Her-2/neu-	20	23,26 [14,99-32,71]	5	25,00 [8,99-45,74]	15	75,00 [54,26-91,01]	0,002
Вік:							
<50	7	35,00 [16,18-56,66]	2	28,57 [3,70-64,68]	5	71,43 [35,32-96,30]	0,109
>50	13	65,00 [43,34-83,82]	3	23,08 [5,17-48,75]	10	76,92 [51,25-94,83]	0,006

Примітка: Частка «Загальна кількість» обрахована від усіх досліджуваних пацієнтів (n=86)

Надмірна експресія COX-2 була більш поширеною в ER-негативних пухлинах, зокрема у 15 (75,00 [54,26-91,01] %, $p=0,002$) хворих з 20 з потрійно-негативним підтипом карциноми і в 14 (73,68 [52,19-90,47] %, $p=0,004$) із 19 хворих з Her2/neu+ підтипом інвазивного протокового раку грудної залози. Потрібно наголосити, що надмірна експресія COX-2 визначалася у пацієток як пременопаузального, так і постменопаузального віку. Кореляційний аналіз за Спірменом продемонстрував достовірний прямий помірний зв'язок між надмірною експресією COX-2 та N ($r= +0,64$; $p=0,002$), N2 ($r= +0,38$; $p < 0,05$), в той же час зворотний високий кореляційний зв'язок з N0 ($r= -0,71$; $p=0,0004$) у випадках потрійно-негативного підтипу карцином. Слабка експресія COX-2 мала достовірний високий прямий зв'язок з відсутністю метастатичного ураження лімфатичних вузлів, тобто з N0 ($r= +0,71$; $p=0,0004$). У пацієток з Her2/neu+ підтипом інвазивного протокового раку грудної залози надекспресія COX-2 аналогічно демонструвала достовірний прямий високий зв'язок з N ($r= +0,77$; $p=0,0001$), помірний прямий зв'язок з N2 ($r= +0,57$; $p=0,01$), а слабка експресія COX-2 мала достовірний прямий високий зв'язок з N0 ($r= +0,88$; $p=0,0006$), тобто у пацієток з Her2/neu+ підтипом і відсутністю метастатичного ураження лімфатичних вузлів була характерна слабка експресія COX-2 у пухлинній тканині.

Що стосується люмінального В раку грудної залози, то згідно з імуногістохімічною класифікацією його можна розділити на 2 підтипи: люмінальний В Her2/neu-негативний, який характеризується експресією ER та/або PR, негативними показниками експресії Her2/neu та високим рівнем Ki-67 (>20%), та люмінальний В Her2/neu-позитивний, якому притаманні експресія ER та/або PR, будь-який рівень Ki-67 та надекспресія або ампліфікація Her2/neu. У пацієток з люмінальним В раком грудної залози з гіперекспресією Her2/neu визначалася надмірна експресія COX-2 у віковій групі до 50 років, а той час, як при іншому підтипі люмінального В раку (з негативною експресією Her2/neu та високим рівнем Ki-67) експресія була слабкою, а в деяких випадках і відсутньою. Кореляційний аналіз за Спірменом

продемонстрував прямий помірний зв'язок між надекспресією COX-2 та розміром пухлини T ($r = +0,36$; $p = 0,009$), N ($r = +0,36$; $p = 0,008$), слабкий прямий зв'язок з N2 ($r = +0,28$; $p = 0,02$), а слабка експресія COX-2 мала прямий помірний кореляційний зв'язок з N0 ($r = +0,40$; $p = 0,05$) і низький прямий зв'язок з розміром пухлини T1 ($r = +0,29$; $p = 0,18$) у пацієток з люмінальним В раком грудної залози з гіперекспресією Her2/neu.

Люмінальний А підтип раку грудної залози характеризувався переважанням дуже слабкої експресії COX-2 у пацієток як пременопаузального, так і постменопаузального віку, зокрема у 20 (80,00 [62,44-93,01] %, $p < 0,001$) із 25 пацієток, з них у 5 (62,50 [28,69-90,54] %, $p > 0,05$) пременопаузального та 15 (88,24 [69,25-98,74] %, $p < 0,001$) постменопаузального віку. Надмірна експресія COX-2 визначалася в поодиноких випадках і переважала у пацієток пременопаузального віку ($p < 0,001$). Кореляційний аналіз аналогічно продемонстрував достовірний прямий помірний зв'язок надекспресії COX-2 з пременопаузальним віком пацієток ($r = +0,44$; $p = 0,03$). Було встановлено достовірні прямі помірні та високі кореляційні зв'язки між надекспресією COX-2 та N ($r = +0,67$; $p = 0,0002$), N2 ($r = +0,87$; $p = 0,00001$), G ($r = +0,48$; $p = 0,01$) та G3 ($r = +0,59$; $p = 0,001$). Слабка експресія COX-2 визначалася у високодиференційованих карциномах G1 ($r = +0,25$; $p > 0,05$), мала прямий помірний кореляційний зв'язок з N0 ($r = +0,34$; $p > 0,05$) і N1 ($r = +0,32$; $p > 0,05$).

Нами також встановлені кореляційні зв'язки між експресією COX-2 та прогностичними параметрами протокового РГЗ загалом без виокремлення підтипу. Кореляційний аналіз продемонстрував достовірні прямі помірні зв'язки надекспресії COX-2 з N ($r = +0,58$; $p = 0,00005$), N2 ($r = +0,51$; $p = 0,00004$) та слабкий прямий зв'язок з G ($r = +0,22$; $p = 0,043$). А слабка експресія COX-2 характеризувалася достовірним помірним прямим зв'язком з N0 ($r = +0,47$; $p = 0,00006$).

У сукупності надмірна експресія COX-2 асоціювалася з агресивним підтипом з метастатичним потенціалом і залежала від гормонального статусу.

Ці результати вказують на те, що СОХ-2 може сприяти прогресії інвазивного протокового раку грудної залози і може бути одним із біомаркерів, які можна використовувати для прогнозування агресивності інвазивних протокових карцином грудної залози. На основі проведених власних досліджень можна стверджувати про важливість ролі експресії СОХ-2, зокрема надмірної, в прогнозі перебігу інвазивного протокового раку грудної залози.

4.3 Експресія CD31 і морфологічні особливості пухлинного ангиогенезу в інвазивному протоковому раку грудної залози

Ангиогенез є одним з ключових чинників пухлинної прогресії, пов'язаний з ростом та метастазуванням злоякісних новоутворень. З використанням антитіл до CD31 (Ab-1, JC70A, Thermo scientific) нами було досліджено 86 випадків інвазивного протокового раку грудної залози. Експресію CD31 оцінювали за позитивним забарвленням ендотелію судин.

У гістологічних препаратах, забарвлених гематоксиліном та еозином, серед комплексів пухлинної паренхіми виявлялися пучки тонких, хвилястих, слабо еозинофільних або базофільних колагенових волокон. Судини нечисленні, переважно капілярного типу. Однак місцями між шарами пухлинної паренхіми виявлялися величезні судини синусоїдного типу, які нагадували лакуни, заповнені еритроцитарними масами або плазмою крові. Стінка таких судин тонка, представлена одним шаром ендотеліальних клітин. Навколо судин виявлялися тонкі прошарки волокнистої сполучної тканини з ознаками набряку, розпушення й ослизнення. Детальне морфологічне дослідження показало, що при інвазивному протоковому раку грудної залози пухлинні судини гетерогенні за морфологією. Залежно від морфологічних особливостей нами було виділено декілька типів або варіантів пухлинних судин та структур з ендотеліальною вистилкою. Це були мікросудини звичайної будови. До цього варіанту ми віднесли капіляри та інші дрібні судини діаметром 5–40 мкм. Щільність дрібних судин у перитуморальній стромі склала $10,5 \pm 2,5$ на умовну одиницю площі, в інтратуморальній стромі

– $11,2 \pm 3,7$ на умовну одиницю площі. Судини були звичайної будови. Стінка капілярів дуже тонка. Сплющений ендотелій, що вистилав такі судини, мав також плоске гіперхромне ядро. Цитоплазма ендотеліальних клітин рівномірно та інтенсивно забарвлювалася маркером CD31 і мала чіткі, рівні контури. Описані судини практично не відрізнялися в перитуморальній та інтратуморальній стромі і їх щільність на умовну одиницю площі також практично не відрізнялася ($p > 0,05$). У просвіті мікросудин виявлялися як еритроцити, так і клітини лейкоцитарного ряду (рис. 4.9). У незначній кількості випадків нами були виявлені капіляри зі слабо вираженою експресією CD31, хоча судини мали звичайну будову, але поряд з цим виявлялися окремо розташовані ендотеліальні клітини в інтратуморальній стромі (рис. 4.10).

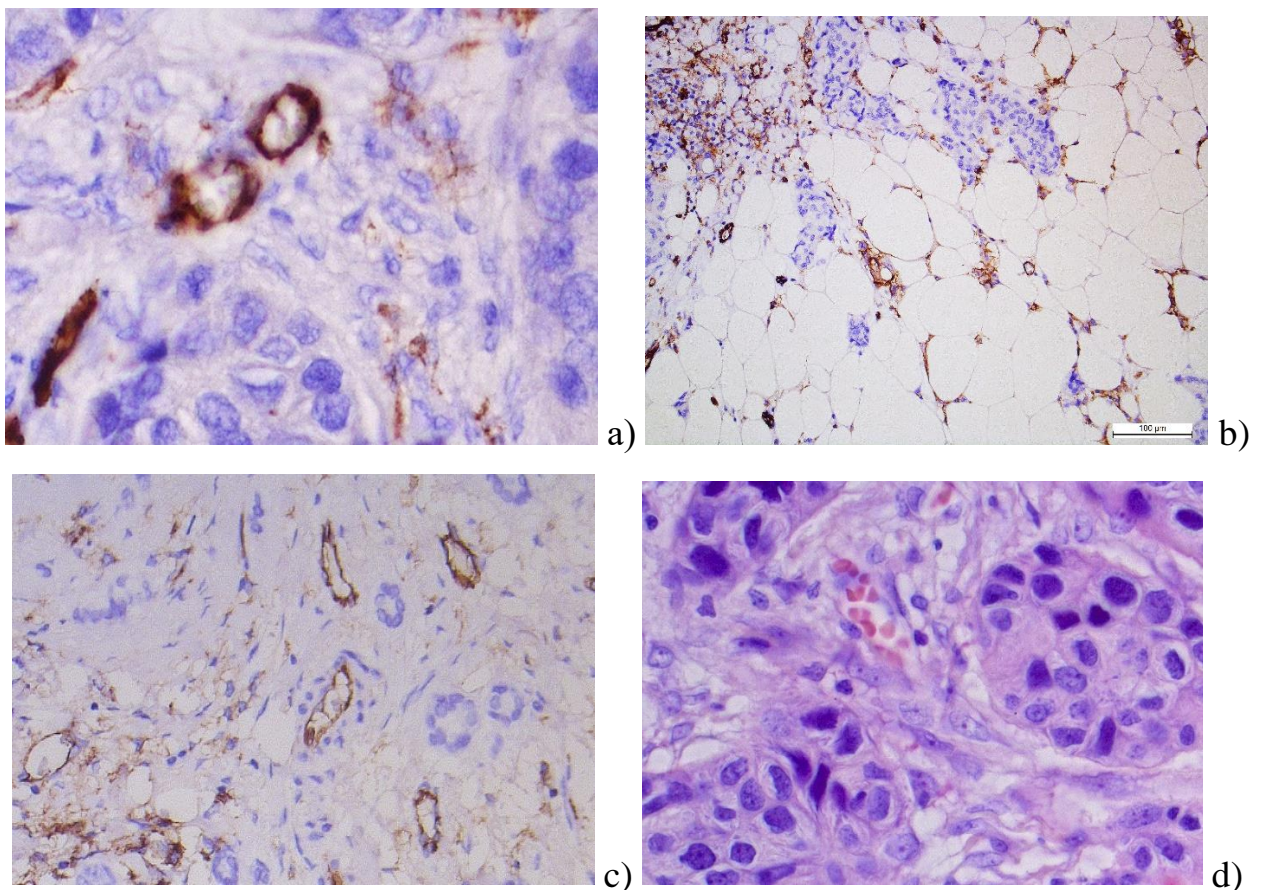


Рисунок 4.9 Мікросудини звичайної будови в інтратуморальній (a, d) та перитуморальній (b, c) стромі. Цитоплазма ендотеліальних клітин рівномірно та інтенсивно забарвлена маркером CD31. ІГХ до CD31 (Clone Ab-1, JC70A). Зб. (a) $\times 600$; b) і c) $\times 200$; Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. (d) $\times 600$.

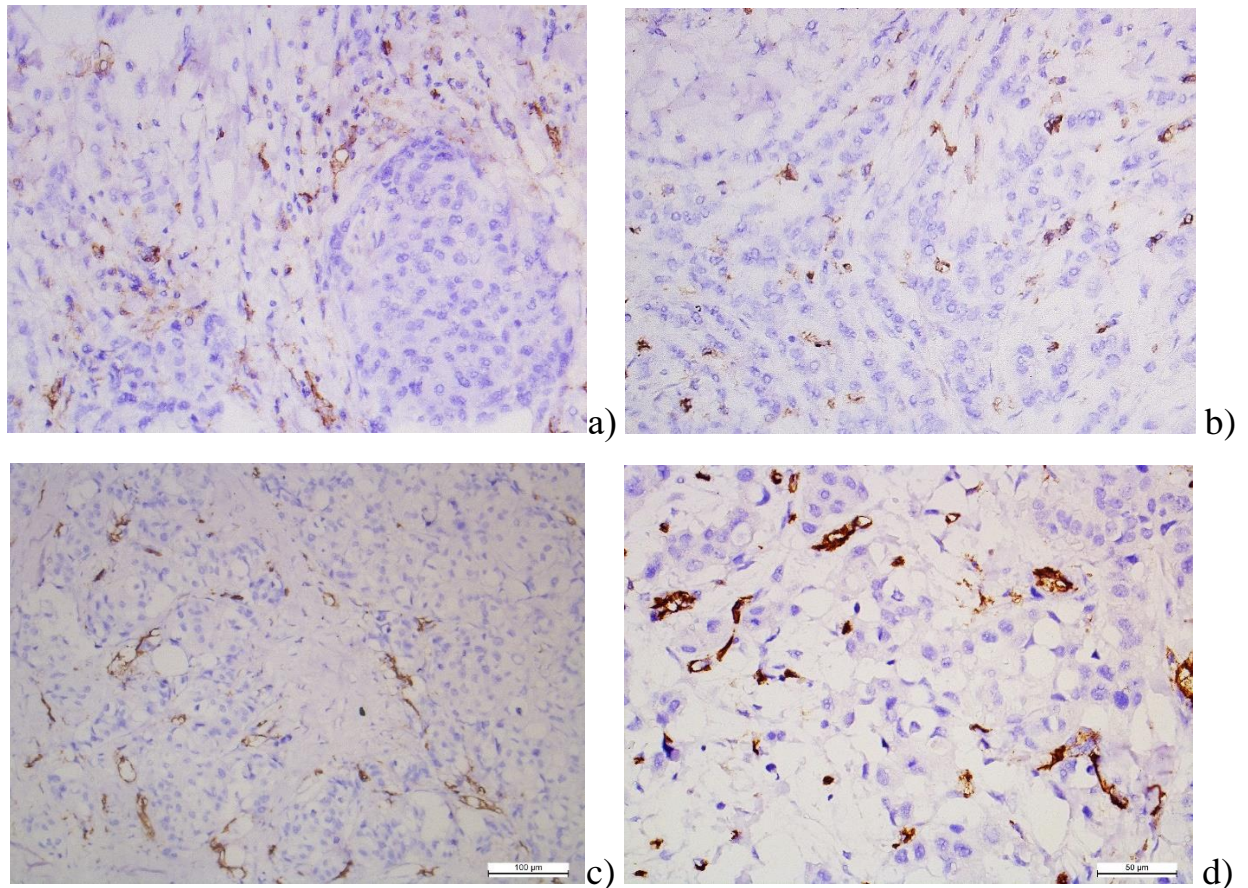


Рисунок 4.10 Капіляри зі слабо вираженою експресією CD31 і окремі ендотеліальні клітини в інтратуморальній стромі (а-с); підвищена експресія CD31 (d). ІГХ до CD31 (Clone Ab-1, JC70A). Зб. (a), (b) і (c) $\times 200$; (d) $\times 400$.

При морфологічному дослідженні інвазивного протокового раку грудної залози деякі пухлинні комплекси були оточені достатньою кількістю стромі, представленої пухкою волокнистою сполучною тканиною, місцями з помірним набряком та явищами метахромазії. Кількість судин мікроциркуляторного русла помітно збільшена в порівнянні з неураженою пухлиною тканиною, в деяких випадках васкуляризація навіть досягала ступеня ангіоматозу. В більшості випадків значна частина капілярів були дилатовані та повнокровні з набряклим ендотелієм. Деякі з капілярів були заповнені пухлинними клітинами і при рутинному дослідженні препаратів, забарвлених гематоксиліном та еозином, імітували невеликі комплекси плоскоклітинного раку.

Виділені нами дилатовані капіляри мали свої особливості, включаючи розмір і форму. Варто зазначити більші розміри і діаметр понад 40 мкм. Що стосується форми, то дилатовані капіляри в більшості випадків мали правильну округлу або овальну форму, але виявлялися капіляри неправильної кутастої форми (рис. 4.11). Дилатовані капіляри ми частіше зустрічали в перитуморальній стромі, хоча внутрішньопухлинно також вони були присутні, але менше.

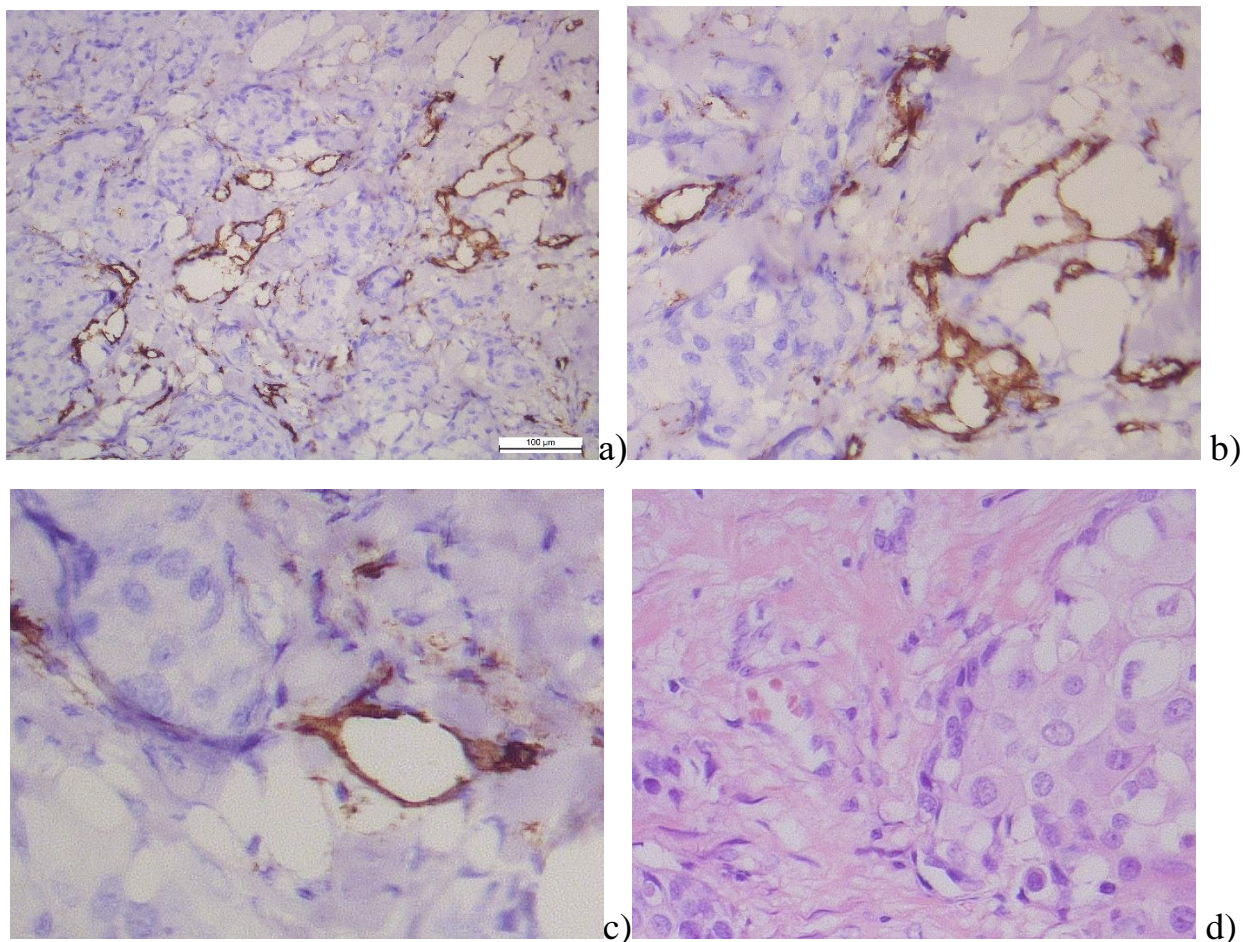


Рисунок 4.11 Дилатовані капіляри різної форми (а-г): округлої, овальної форми і неправильної кутастої форми. Цитоплазма ендотеліальних клітин рівномірно та інтенсивно забарвлена маркером, має чіткі контури. ІГХ до CD31 (Clone Ab-1, JC70A). Зб. (а) $\times 200$; (б) $\times 400$; (в) $\times 600$; (д) перитуморальна строма. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. $\times 400$.

Також ми діагностували в значній кількості дилатовані капіляри, які не забарвлювались CD31 маркером, це були лімфатичні судини (для їх верифікації необхідне ІГХ дослідження з подопланіном). Морфологічна особливість дилатованих судин полягала в ендотеліальній вистилці, яка характеризувалася клітинами з великими і світлими ядрами, а також хроматином з дрібною сітчастою структурою (на імерсії $\times 900$). Цитоплазма ендотеліальних клітин інтенсивно чітко забарвлювалась CD31 маркером.

Поодинокі та множинні дилатовані капіляри зустрічалися однаково часто – по 46,0% випадків, лише у 8,0% випадків ми не виявили описаних судин у тканині пухлини. В частині спостережень нами виявлено також розширені дилатовані капіляри, але зі слабо виразною експресією CD31, причому форма судин була правильна з рівними контурами.

Окрім того, у внутрішньопухлинній стромі нами було виявлено атипові дилатовані капіляри, які відрізнялися від судин біля інвазивного краю. Вони були представлені розширеними судинами неправильної форми, діаметром понад 40 мкм. Характерною особливістю атипових дилатованих судин була ендотеліальна вистилка, в якій ендотеліоцити нашаровувалися одні на одних, їх контури не чітко візуалізувалися, були нерівними і в просвіті судин часто визначалися окремі CD31 позитивні клітини, не пов'язані з ендотеліальною вистилкою. Такі атипові синусоїди розташовувалися переважно у внутрішньопухлинній стромі (рис. 4.12). Атипові дилатовані капіляри діагностувалися як множинні – у 40,4% випадків, як поодинокі – у 38,8% випадків і не визначалися у 20,8% випадків.

При морфологічному дослідженні поряд з нормальними та ектазованими капілярами було виявлено порожнисті округлої та овальної форми структури з частковою ендотеліальною вистилкою і характерні комірчасті структури. Такі капіляри з частковою ендотеліальною вистилкою були і множинними (28,6%), і поодинокими (38,9%), і відсутніми (32,5%). Характерним було також те, що одночасно визначалися ще й структури без ендотеліальної вистилки та атипові синусоїди (рис. 4.13).

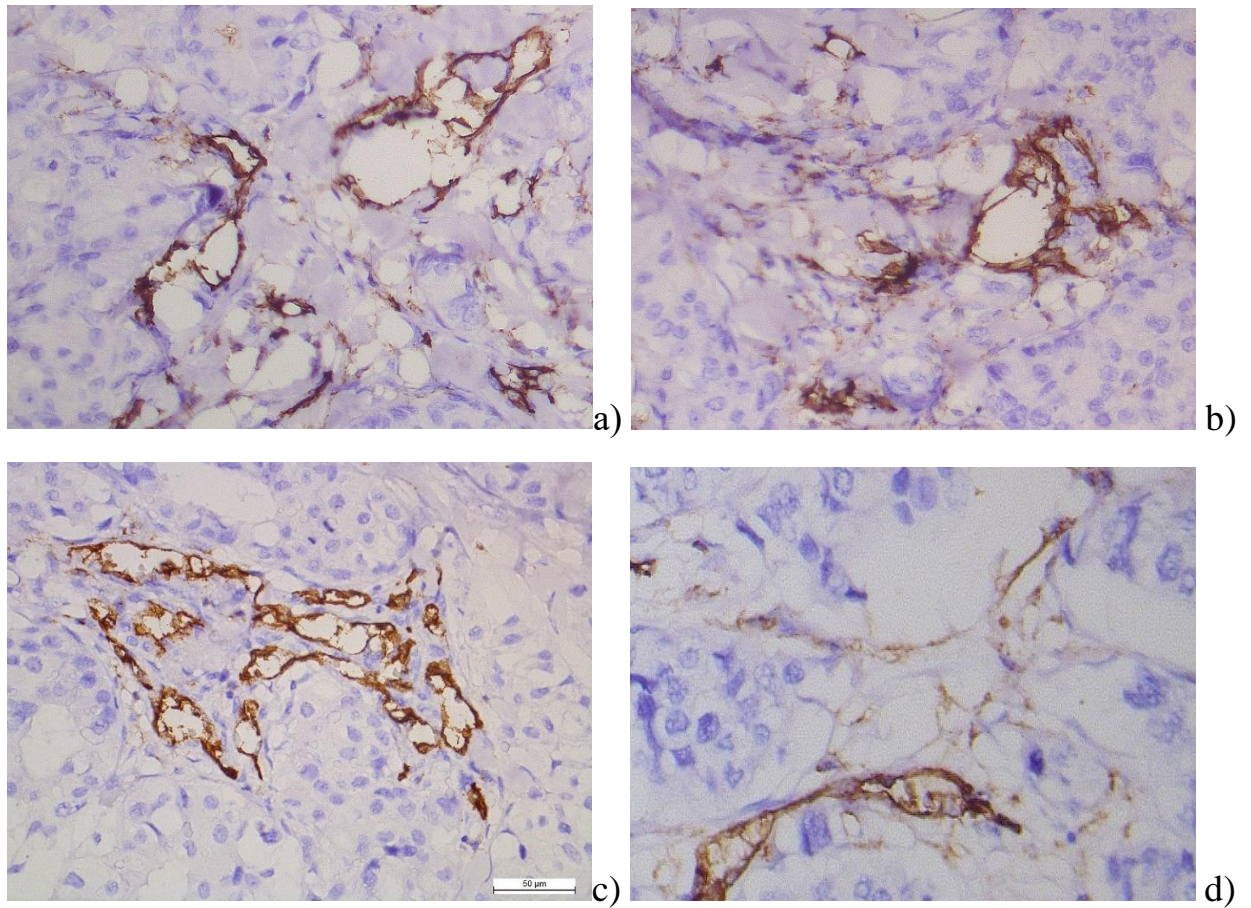


Рисунок 4.12 Атипові дилатовані капіляри у внутрішньопухлинній стромі. Вистилка судин представлена хаотично розташованими ендотеліальними клітинами, які нашаровуються одні на другі. ІГХ до CD31 (Clone Ab-1, JC70A). Зб. (a-c) $\times 400$; d) $\times 600$.

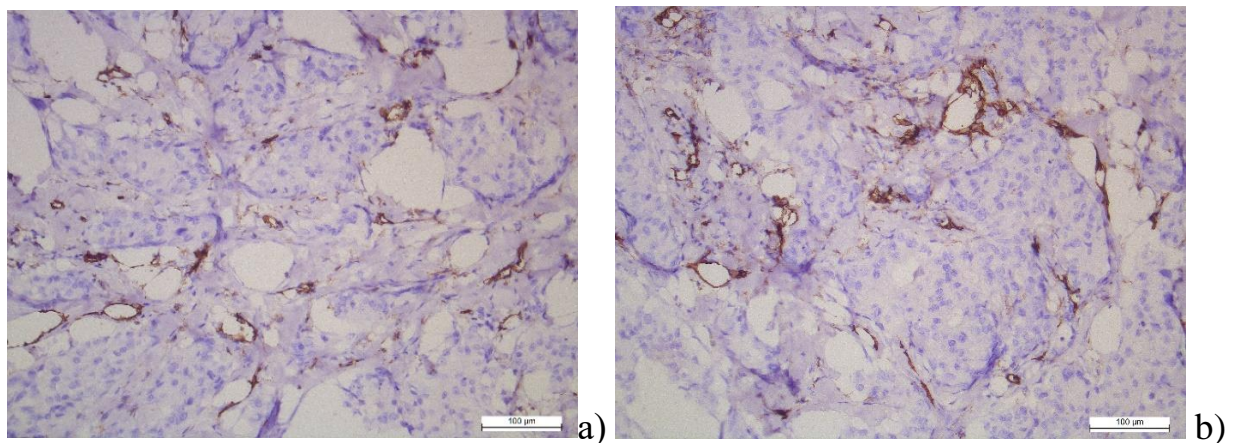


Рисунок 4.13 Структури округлої і овальної форми з частковою ендотеліальною вистилкою у внутрішньопухлинній стромі, без ендотеліальної вистилки поряд з нормальними та ектазованими капілярами. ІГХ до CD31 (Clone Ab-1, JC70A). Зб. (a-b) $\times 200$.

Крім того, при морфологічному дослідженні нами виявлені артефакти ретракції, тобто наявність перитуморальної щілини, яка відокремлює пухлинні структури або групи пухлинних клітин від оточуючої стромы (рис. 4.14). В гістологічних зрізах пухлинної тканини цей порожній простір, який частково або повністю оточує навколишні гнізда пухлинних клітин, у низці випадків може імітувати лімфо-судинну інвазію або наявність пухлинних емболів у просвіті лімфатичних судин. ІГХ з CD31 та подопланіном є важливою з точки зору верифікації структур судинного генезу.

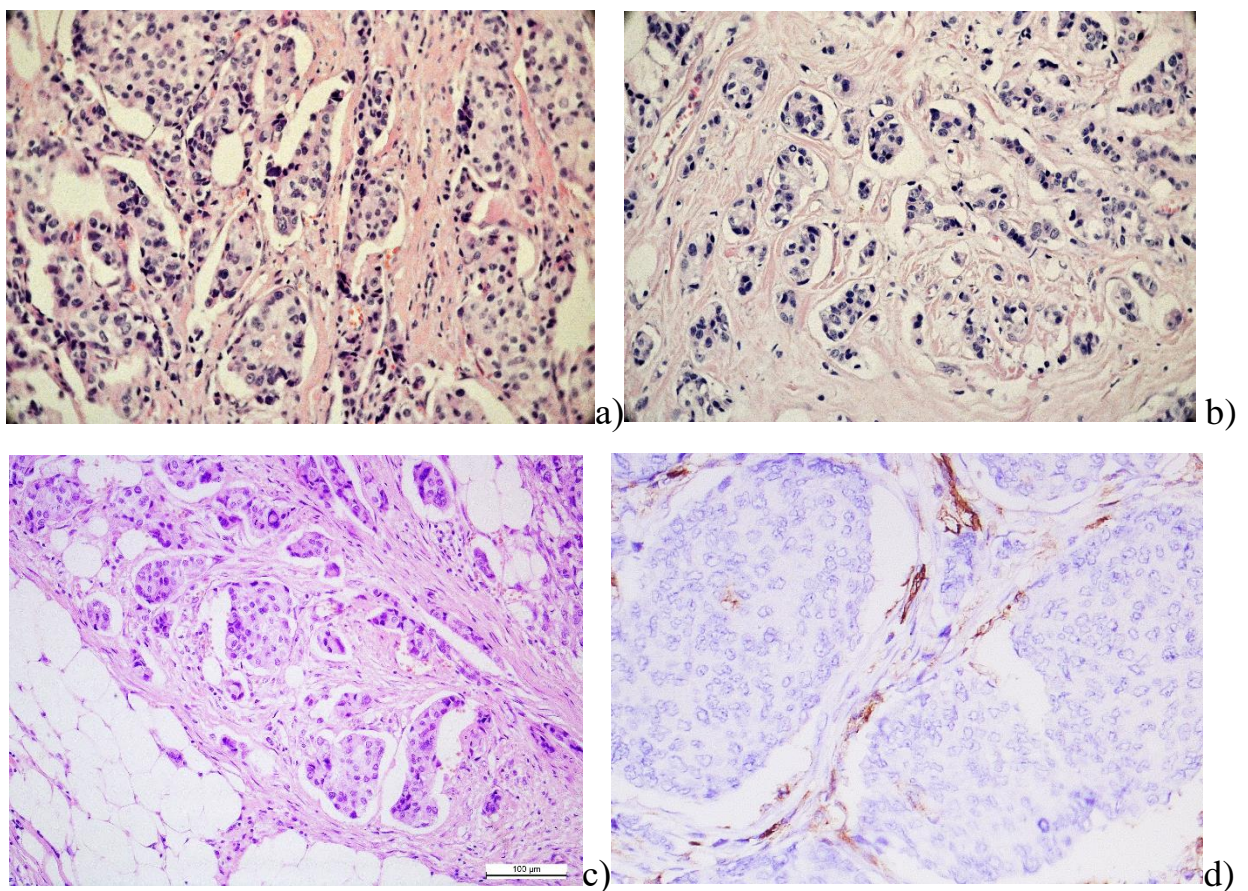


Рисунок 4.14 Наявність перитуморальної щілини (ретракційного простору) в інвазивному компоненті протокового раку грудної залози. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Зб. (а-с) $\times 200$. ІГХ до CD31 (Clone Ab-1, JC70A). Зб. d) $\times 400$.

Раніше утворення даної щілини розглядали як артефакт, що виникає внаслідок дефектів фіксації та виготовлення гістологічних зрізів [267].

Пізніше було встановлено, що виникнення ретракційного простору навколо пухлинних структур може бути результатом взаємодій атипівих клітин з елементами пухлинного мікрооточення, зокрема зі стромальними компонентами, і пов'язане з несприятливим прогнозом [268, 269].

Таким чином, за результатами проведеного дослідження найбільш демонстративними структурами з прогностичної точки зору були атипіві дилатовані судини та структури з частковою ендотеліальною вистилкою, а також наявність характерних пористих структур у пухкій волокнистій неоформленій сполучній тканині перитуморальної стромі. Множинні структури з частковою ендотеліальною вистилкою частіше зустрічалися при помірному та високому ступені злоякісності пухлини (Grade 2-3), при негативному статусі пухлини. Значна кількість структур з частковою ендотеліальною вистилкою спостерігалася при HER-2/neu позитивному та потрійно негативному РГЗ ($p < 0,05$). Наявність характерного ретракційного простору навколо пухлинних структур асоціювалася також з HER-2/neu позитивним статусом. Описані структури достовірно частіше зустрічалися при позитивному статусі HER-2/neu, ніж при негативному ($p < 0,05$). Що стосується щільності розташування мікросудин, потрібно відзначити більш високі значення щільності в інтратуморальній стромі при G3 ступені диференціації, при потрійно негативному РГЗ і при HER-2/neu позитивному. Не встановлено відмінностей у щільності мікросудин залежно від віку пацієнток.

Нами встановлені кореляційні зв'язки між гетерогенними судинами за морфологією: дилатованими, атипівими дилатованими капілярами в інтратуморальній та перитуморальній стромі, структурами з частковою ендотеліальною вистилкою та прогностичними параметрами категорії I, що включала інформацію про стадії класифікації (TNM), ступінь диференціації (G) та статус гормональних рецепторів.

Відсутність дилатованих капілярів у пухлинній тканині характеризувалася прямою помірною кореляцією з високодиференційованими карциномами G1 ($r = +0,49$; $p = 0,000001$), з розміром пухлини T1 ($r = +0,24$;

$p=0,03$) та не враженими метастазами лімфатичними вузлами N0 ($r= +0,32$; $p=0,002$). Одиначні дилатовані капіляри мали прямий кореляційний зв'язок з N0 ($r= +0,22$; $p=0,04$) і помірно диференційованими пухлинами G2 ($r= +0,29$; $p=0,01$). А вже множинні дилатовані капіляри характеризувалися наявністю прямих кореляційних зв'язків з T ($r= +0,27$; $p=0,01$), з N ($r= +0,46$; $p=0,000008$), з N2 ($r= +0,36$; $p=0,0007$), з G ($r= +0,43$; $p=0,00004$) і G3 ($r= +0,36$; $p=0,0006$).

Що стосується атипівих дилатованих капілярів, то їх відсутність в карциномі корелювала з N0 ($r= +0,31$; $p=0,003$) та G1 ($r= +0,49$; $p=0,000001$). Атипіві поодинокі дилатовані капіляри характеризувалися наявністю слабкого прямого кореляційного зв'язку з G2 ($r= +0,22$; $p=0,04$), а множинні атипіві дилатовані капіляри мали помірні кореляційні зв'язки з N ($r= +0,43$; $p=0,00004$), з N2 ($r= +0,40$; $p=0,0001$), з G ($r= +0,39$; $p=0,0002$) і з G3 ($r= +0,33$; $p=0,002$).

Крім того, нами встановлені кореляційні зв'язки між структурами з частковою ендотеліальною вистилкою, які могли бути одиначними, множинними і відсутніми в пухлинній тканині. Так, одиначні структури з частковою ендотеліальною вистилкою характеризувалися наявністю прямих слабких кореляційних зв'язків з N1 ($r= +0,26$; $p=0,02$) та з G2 ($r= +0,22$; $p=0,04$), множинні структури з частковою ендотеліальною вистилкою характеризувалися прямими помірними і слабкими кореляціями з N2 ($r= +0,44$; $p=0,00001$) та з G3 ($r= +0,22$; $p=0,05$).

Нами проведений кореляційний аналіз між гетерогенними за морфологією судинами (дилатованими, атипівими дилатованими капілярами в інтратуморальній та перитуморальній стромі, структурами з частковою ендотеліальною вистилкою) та прогностичними параметрами категорії I в люмінальних та нелюмінальних карциномах грудної залози.

Люмінальний А підтип карцином характеризувався наявністю кореляційних зв'язків між поодинокими дилатованими капілярами в пухлинній тканині та ступенем диференціації G3 ($r= -0,39$; $p=0,05$), між множинними дилатованими капілярами та N2 ($r= +0,46$; $p=0,02$), G3 ($r= +0,47$;

$p=0,02$). Пухлини грудної залози, в яких дилатовані капіляри не діагностувалися, мали кореляційні зв'язки з T1 ($r= +0,43$; $p=0,03$), з N0 ($r= +0,43$; $p=0,03$) та G1 ($r= +0,59$; $p=0,001$). Що стосується атипівих дилатованих капілярів, їх відсутність у пухлині корелювала з G1 ($r= +0,56$; $p=0,003$), наявність одиничних атипівих дилатованих капілярів корелювала з G2 ($r= +0,51$; $p=0,01$), а множинні атипіві дилатовані капіляри характеризувалися наявністю кореляцій з N ($r= +0,56$; $p=0,003$), з N2 ($r= +0,70$; $p=0,00009$), з G ($r= +0,50$; $p=0,01$) та з G3 ($r= +0,68$; $p=0,0002$). Кореляційний аналіз між структурами з частковою ендотеліальною вистилкою показав наступне. Відсутність таких структур достовірно прямо і помірно корелювала з високодиференційованими карциномами G1 ($r=0,56$; $p=0,003$). Одиничні структури з частковою ендотеліальною вистилкою корелювали з G2 ($r=0,51$; $p=0,01$), в той час як множинні такі структури корелювали з N2 ($r= +0,70$; $p=0,00009$) та G3 ($r= +0,68$; $p=0,0002$).

Для люмінального B підтипу були визначені наступні кореляційні зв'язки: карциноми з відсутніми дилатованими капілярами корелювали з N0 ($r= +0,61$; $p=0,004$) та G1 ($r= +0,55$; $p=0,01$). Випадки пухлин з одиничними і множинними дилатованими капілярами мали кореляційні зв'язки з G2 ($r= +0,59$; $p=0,006$) та G3 ($r= +0,69$; $p=0,001$), відповідно. У разі відсутності атипівих дилатованих капілярів нами було встановлено достовірний кореляційний зв'язок з N0 ($r= +0,35$; $p=0,01$), а наявність поодиноких атипівих дилатованих капілярів корелювала з N2 ($r= +0,51$; $p=0,02$). Подібна картина склалася в кореляційному аналізі зі структурами з частковою ендотеліальною вистилкою. Було встановлено прямий кореляційний зв'язок між відсутністю лімфогенних метастазів та відсутністю структур з частковою ендотеліальною вистилкою ($r= +0,58$; $p=0,01$). Причому наявність поодиноких таких структур з частковою ендотеліальною вистилкою корелювала з N2 ($r= +0,57$; $p=0,01$).

Пухлини грудної залози з Her2+ підтипом характеризувалися наявністю високого кореляційного зв'язку між високим ступенем диференціації пухлини і відсутністю дилатованих капілярів ($r= +1,0$). Одиничні дилатовані капіляри

діагностувалися в пухлинах розміром T1 ($r = +0,47$; $p = 0,04$), без лімфогенних метастазів N0 ($r = +0,64$; $p = 0,002$). Відсутність атипових дилатованих капілярів корелювала з високодиференційованими пухлинами G1 ($r = +0,69$; $p = 0,001$). А множинні атипові дилатовані капіляри мали середню позитивну кореляцію з великими за розміром пухлинами T3 ($r = +0,57$; $p = 0,01$). Відсутність структур з частковою ендотеліальною вистилкою була характерною для пухлин розміром T1 ($r = +0,43$; $p = 0,05$). Одиначні структури з частковою ендотеліальною вистилкою діагностувалися в пухлинах T2 ($r = +0,42$; $p = 0,05$), а множинні структури з частковою ендотеліальною вистилкою – в пухлинах T3 ($r = +0,44$; $p = 0,05$).

Що стосується потрійного негативного підтипу PГЗ, нами було встановлено високі кореляційні зв'язки між наявністю дилатованих капілярів і N ($r = +0,74$; $p = 0,0002$), наявністю множинних дилатованих капілярів і N ($r = +0,72$; $p = 0,0003$), наявністю атипових дилатованих капілярів і N ($r = +0,77$; $p = 0,0007$) і наявністю множинних атипових дилатованих капілярів і N ($r = +0,72$; $p = 0,0003$). Також нами встановлено кореляційні помірні зв'язки між наявністю одиначних дилатованих капілярів і відсутніми лімфогенними метастазами N0 ($r = +0,49$; $p = 0,03$), множинних дилатованих капілярів і N2 ($r = +0,50$; $p = 0,02$), наявністю атипових дилатованих капілярів і N2 ($r = +0,57$; $p = 0,01$). Окрім того, нами встановлено кореляційні зв'язки між судинами з частковою ендотеліальною вистилкою та лімфогенними метастазами і ступенем диференціації пухлини. Так, відсутність судин з частковою ендотеліальною вистилкою корелювала з відсутністю лімфогенних метастазів (N0) ($r = +0,47$; $p = 0,04$), одиначні структури з частковою ендотеліальною вистилкою мали пряму позитивну кореляцію з N1 ($r = +0,59$; $p = 0,01$), а множинні структури з частковою ендотеліальною вистилкою мали високий прямий позитивний кореляційний зв'язок з N2 ($r = +0,76$; $p = 0,0001$) і помірний з G4 ($r = +0,46$; $p = 0,04$).

Морфологічними дослідженнями доведено, що судини в пухлині є нестабільними, незрілими, не мають повноцінної базальної мембрани та

перипіттів. На відміну від нормальних судин пухлинні судини не формують венул, артеріол та капілярів, а утворюють хаотичну сітку з судин усіх типів одночасно. Судинна сітка в пухлинах «негерметична» і часто викликає кровотечі, зумовлені надмірним виробленням фактору VEGF.

Важливо підкреслити, що при вивченні особливостей ангиогенезу необхідно враховувати чинники, які безпосередньо впливають на процеси ангиогенезу чи пов'язані з ними загальними механізмами. До таких факторів можна віднести запальну інфільтрацію стромы пухлини та епітеліально-мезенхімальну трансформацію пухлинних клітин (EMT). Ціла низка досліджень свідчить про те, що процеси ангиогенезу та EMT тісно взаємопов'язані і можуть регулюватися одними і тими ж механізмами [222-224, 270, 271]. У роботі D. Ribatti [225] було зазначено, що при EMT та ангиогенезі у клітинах спостерігаються схожі процеси: втрата полярності та маркерів клітинної адгезії, реорганізація цитоскелету з набуттям мезенхімальної морфології та здатності до міграції.

4.4 Особливості лімфоїдного мікрооточення (CD3, CD20, CD56) в інвазивному протоковому раку грудної залози

Запальний інфільтрат в мікрооточенні пухлини складається з безлічі популяцій клітин, які чинять різноманітний вплив на пухлинні клітини, починаючи від стимулювання розвитку пухлини до пригнічення її росту. Детально досліджуються субпопуляції Т-лімфоцитів, зокрема CD4⁺ Т-хелперів/індукторів та CD8⁺ супресорів/цитотоксичних клітин, В-лімфоцитів, НК-клітин. Активність субпопуляцій Т-клітин варіює від цитотоксичності щодо злоякісних клітин і посилення протипухлинної відповіді до індукції імунотолерантності і пригнічення імунітету. Інфільтруючі пухлину В-лімфоцити є джерелом протипухлинних антитіл, в той час як НК-клітини, подібно до Т-клітин, схильні пригнічувати ріст пухлини та її поширення завдяки їхньої цитотоксичності.

При раку грудної залози пухлино-інфільтруючі лімфоцити є більше поширені в стромі порівняно з внутрішньопухлинними ділянками, і стромальний лімфоцитарний інфільтрат знаходиться не в прямому контакті з пухлинними клітинами. Внутрішньопухлинні або інтратуморальні пухлино-інфільтруючі лімфоцити визначаються як інтраепітеліальні моноклеарні клітини, що знаходяться в гніздах пухлинних клітин або безпосередньо контактують з пухлинними клітинами. Визначення особливостей лімфоїдного мікрооточення пухлини є важливим кроком на шляху до потенційного використання пухлино-інфільтруючих лімфоцитів як прогностичного біомаркера при раку грудної залози.

З використанням антитіл до CD3, CD20, CD56 нами було проведене імуногістохімічне дослідження інвазивного протокового раку грудної залози та оцінено розподіл інфільтруючих пухлину Т-і В-лімфоцитів та НК-клітин в різних молекулярних підтипах і встановлено їх взаємозв'язок зі ступенем диференціації пухлини.

Щільність скупчень Т-клітин, В-клітин та НК-клітин з урахуванням молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози та статусу HER2-neu представлено у таблиці 4.6. Значення вимірювали як відсоток позитивно забарвлених імунних клітин до загальної кількості клітин в полі зору.

Таблиця 4.6

Морфометричні параметри Т-клітин, В-клітин та НК-клітин з урахуванням молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози; значення вимірювали як відсоток позитивно забарвлених імунних клітини до загальної кількості клітин в полі зору

Молекулярний підтип	Т-лімфоцити (CD3)		В-лімфоцити (CD20)		НК (CD56)	
	внутрішньо-пухлинні (%)	інвазивний край (%)	внутрішньо-пухлинні (%)	інвазивний край (%)	внутрішньо-пухлинні (%)	інвазивний край (%)
Люмінальний А підтип	7,15±0,13	18,75±0,64	3,21±0,12	6,66±0,15	1,02±0,03	4,39±0,12
Люмінальний В підтип/ HER2 +	14,85±0,21**	39,98±3,24**	5,44±0,16*	17,88±0,75**	1,24±0,07*	5,14±0,18
Люмінальний В підтип / HER2 – Ki-67 ≥20%	9,75±0,25***##	27,83±2,17***##	3,54±0,11***##	12,57±0,43***##	1,12±0,04**	4,73±0,16**

продовження табл.4.6

HER2-neu +/- нелюмінальний	23,73±1,34 ^{**##^}	45,94±2,13 ^{**^}	5,76±0,13 ^{**^^}	25,82±1,19 ^{**##^}	2,25±0,06 ^{**##^}	6,39±0,11 ^{**##^}
Потрійний негативний (TNBC)	28,15±2,13 ^{**##^}	48,57±2,25 ^{**##^}	6,31±0,19 ^{**##^}	20,15±0,72 ^{**##^}	2,42±0,08 ^{**##^^}	7,76±0,13 ^{**##^}

Примітки:

- У всіх варіантах порівняння показників за видами лімфоцитів, внутрішньопухлинних, за інвазивним краєм встановлено достовірну різницю $p < 0,001$
- * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – різниця показників люмінального А підтипу з іншими підтипами
$p < 0,05$, ## $p < 0,01$ – різниця показників люмінального В підтипу/ HER2 + з іншими підтипами
^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$ – різниця показників люмінального В підтипу /Ki-67 $\geq 20\%$ з іншими підтипами
γ $p < 0,05$, γγ $p < 0,01$ – різниця показників HER2-neu +/- нелюмінальний з потрійний негативний (TNBC)

Щільність скупчень Т- і В-лімфоцитів була більшою внутрішньопухлинно і біля інвазивного краю в нелюмінальних підтипах в порівнянні з люмінальними А і В підтипами. Щільність скупчень внутрішньопухлинних Т-лімфоцитів була найвищою в потрійному негативному раку і значно достовірно переважала за щільність в люмінальному підтипі А ($p < 0,01$).

Аналогічним чином, люмінальний підтип А характеризувався нижчою щільністю скупчень Т-лімфоцитів біля інвазивного краю в порівнянні з потрійними негативними пухлинами, HER2-neu позитивними і люмінальним підтипом В ($p < 0,01$) (рис. 4.15).

Для субпопуляції В-лімфоцитів щільність CD20 також збільшувалася від пухлин люмінального підтипу до нелюмінальних потрійних негативних і HER2-neu позитивних пухлин. В-клітинний інфільтрат на інвазивному краї був більш виразний в пухлинах нелюмінального підтипу. Але в порівнянні зі щільністю Т-лімфоцитів, В-клітинний інфільтрат був достовірно ($p < 0,01$) менш виражений в пухлинах як люмінального, так і нелюмінального підтипів (рис. 4.16).

Що стосується НК-клітин, то щільність розподілу натуральних кілерів була найнижчою в порівнянні з субпопуляціями Т- і В-лімфоцитів, як інтрамурально, так і на інвазивному краї пухлин люмінального та нелюмінального підтипів ($p < 0,001$) (рис. 4.17).

При дослідженні Т-лімфоцитарного інфільтрату в люмінальному підтипі пухлин найбільша щільність скупчень CD3 виявлена на інвазивному краї люмінального В/ HER2 + в порівнянні з люмінальним А і люмінальним В /Кі-67 позитивним, відповідно до класифікації Санкт-Галлена 2015 і 2013 рр. (Кі-67 $\geq 20\%$ і $\geq 14\%$ відповідно), ($p < 0,05$).

Підвищена кількість Т- і В-лімфоцитів на краю інвазії також спостерігалася в пухлинах з надекспресією HER2-neu, як при оцінці у відсотках від загальної кількості клітин в тканині пухлини, так і відповідно до візуально-аналогової шкали.

Якісна й кількісна оцінка інтенсивності експресії Т- і В- та NK-клітин продемонструвала також різний ступінь експресії лімфоцитів в залежності від молекулярного підтипу і розташування інфільтрату. Люмінальний підтип А характеризувався достовірним переважанням помірної експресії (2+) CD3 як внутрішньопухлинно, так і на інвазивному краї пухлини ($p < 0,05$), в той час, як у люмінальному В та Her2+ підтипах інтенсивність експресії CD3 була нижчою і в деяких випадках переважала на рівні 1+. Потрійно негативні пухлини характеризувалися експресією (3+) CD3 внутрішньопухлинно і на інвазивному краї пухлини у всіх досліджуваних випадках.

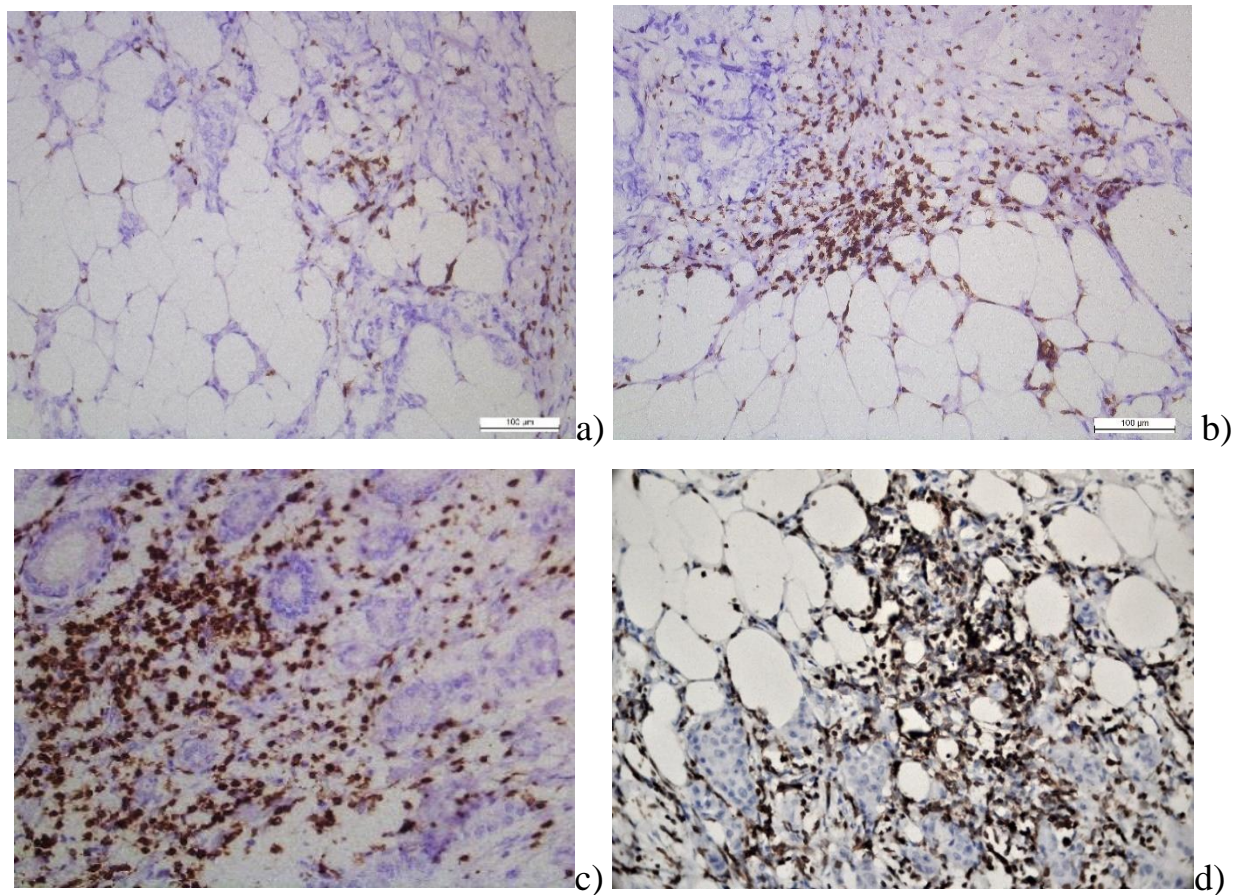
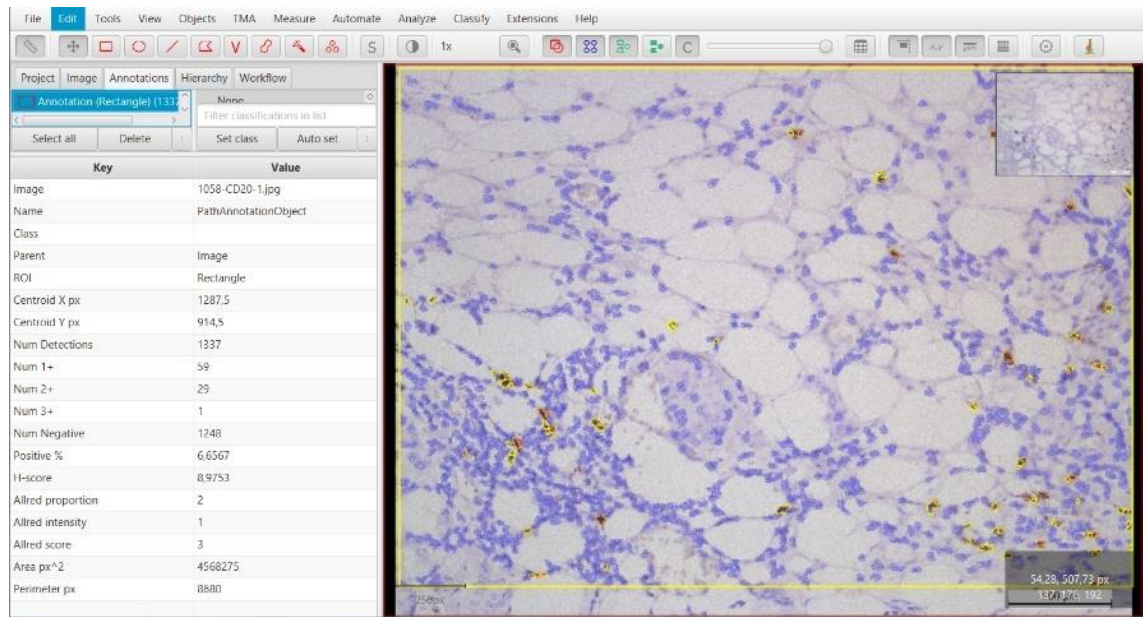


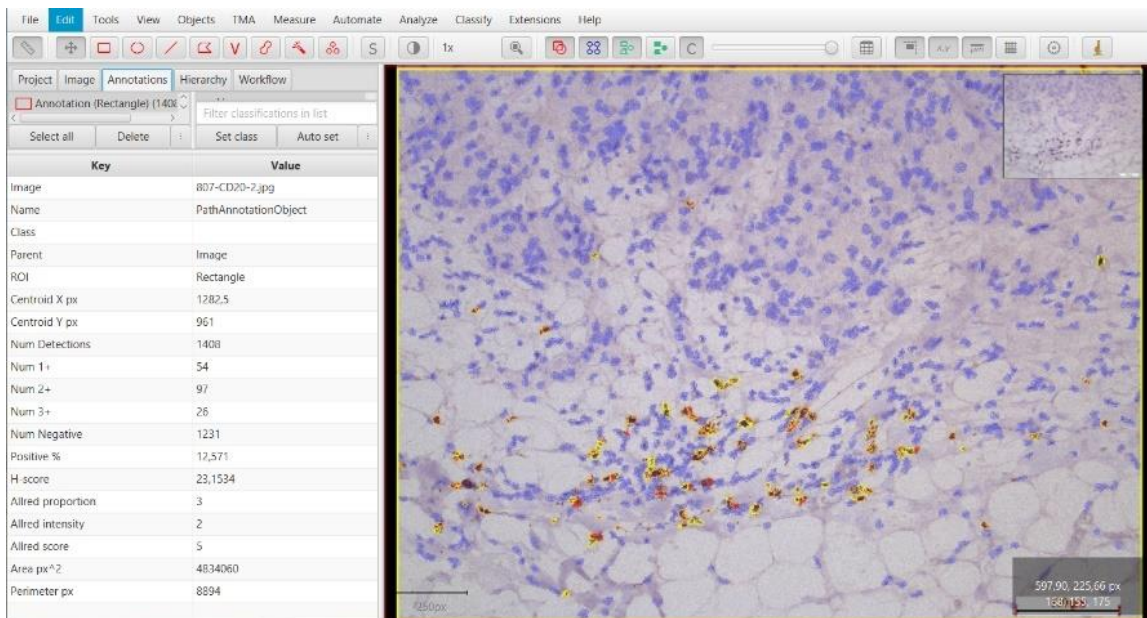
Рисунок 4.15 Т-лімфоцити біля інвазивного краю протокового раку грудної залози, інтенсивність експресії CD3. а) – люмінальний підтип А; б) – люмінальний В підтип; с) – Her2/neu+; д) – потрійний негативний молекулярний підтип. ІГХТ до CD3 (Clone SP7, Thermo scientific). 36. $\times 200$.

Інтенсивність експресії В-клітин (CD20) характеризувалася слабким ступенем на рівні 1+ у люмінальному А підтипі (66,3% клітин з 1+), 2+ – у

люмінальному В (54,8% клітин з 2+) і Her2+ підтипах (51,5% клітин з 2+), а в потрійному негативному раку детекція відповідно до візуально-аналогової шкали в багатьох випадках демонструвала найвищу інтенсивність на рівні 3+, хоча в окремих випадках найвища інтенсивність 3+ визначалась на рівні 4,4%, при чому переважав слабкий ступінь інтенсивності 1+ на рівні 61,9%.



a)



b)

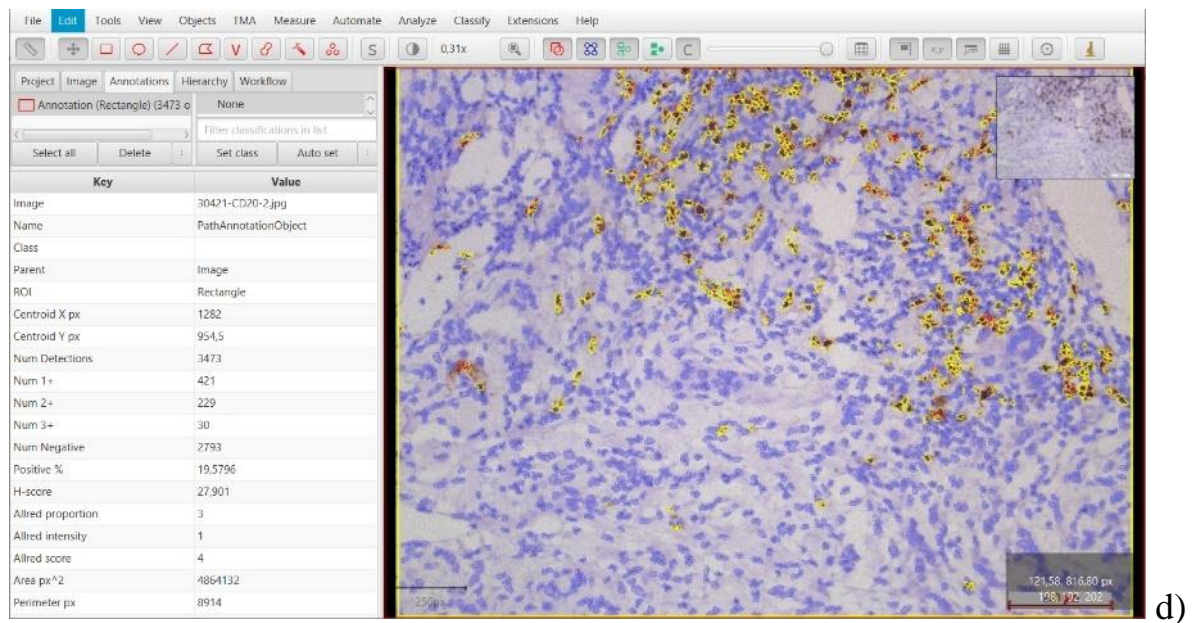
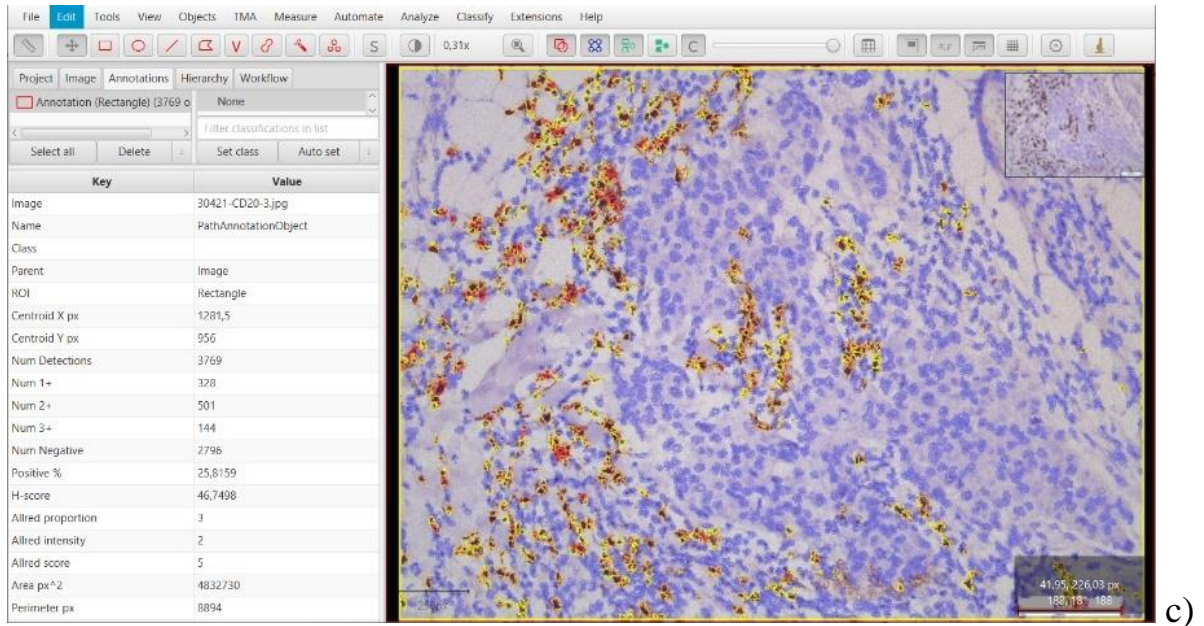
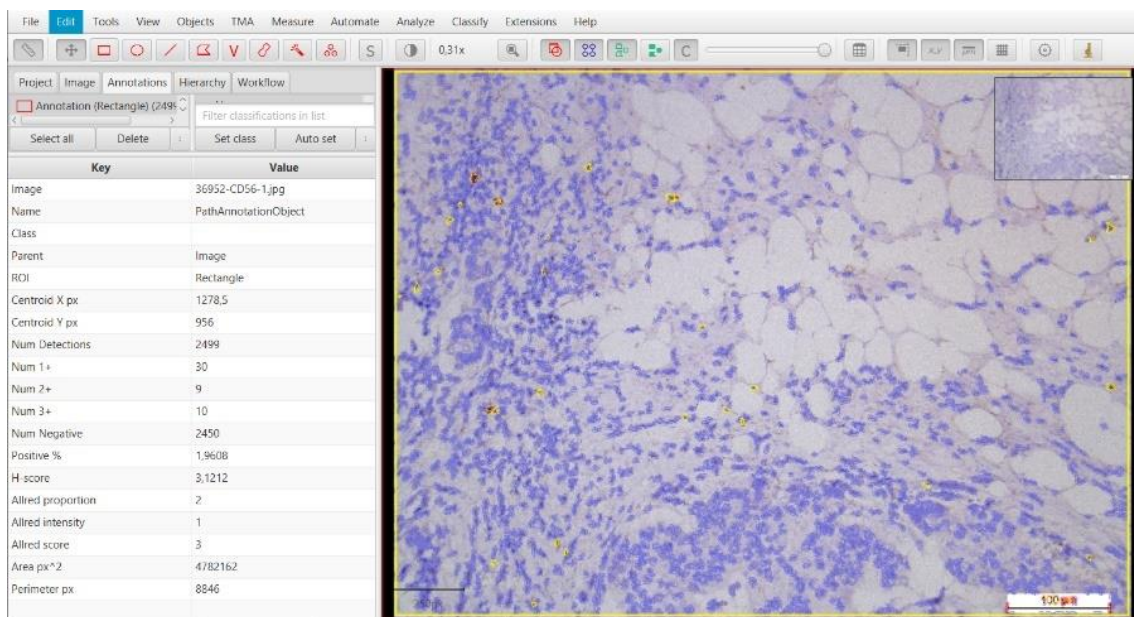
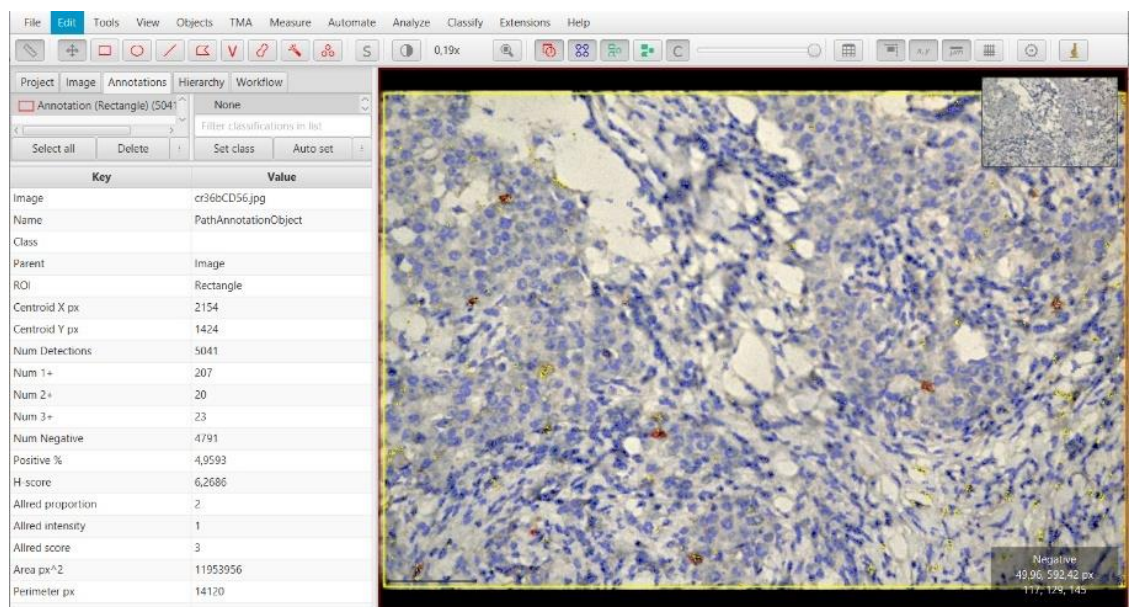


Рисунок 4.16 В-лімфоцити біля інвазивного краю протокового раку грудної залози, інтенсивність експресії CD20. а) – люмінальний А підтип; б – люмінальний В підтип /Ki-67 $\geq 20\%$; с – Her2/neu+; д – потрійний негативний молекулярний підтип. ІГХТ до CD20 (Clone L26, Thermo scientific). 36. $\times 200$. Програмна платформа QuPath.

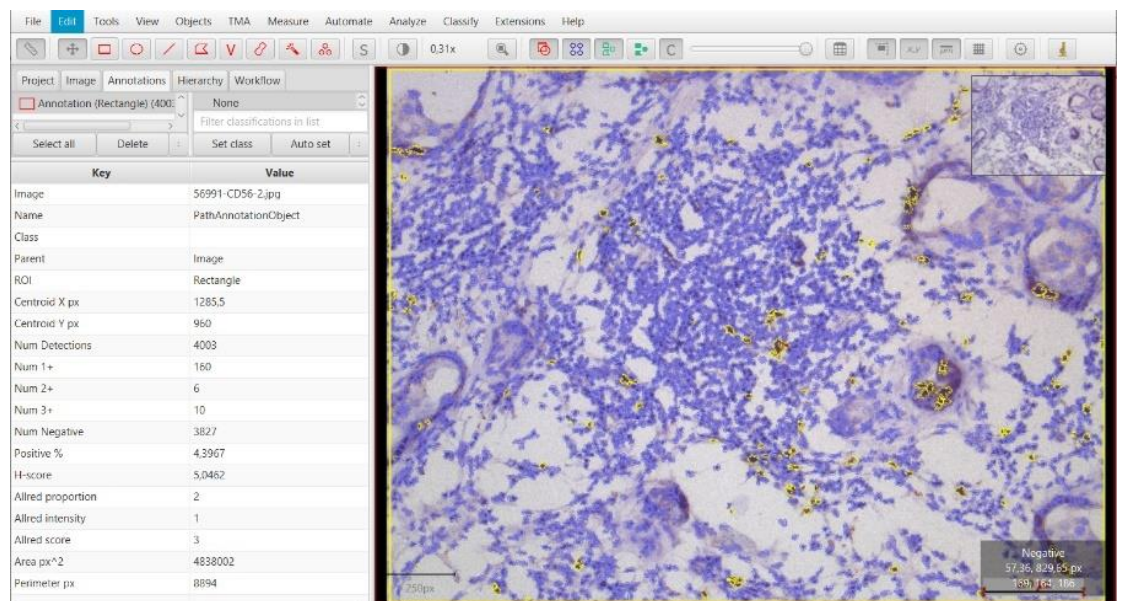
Щодо НК-клітин (CD56), то інтенсивність їх експресії була слабкою (1+) у всіх молекулярних підтипах.



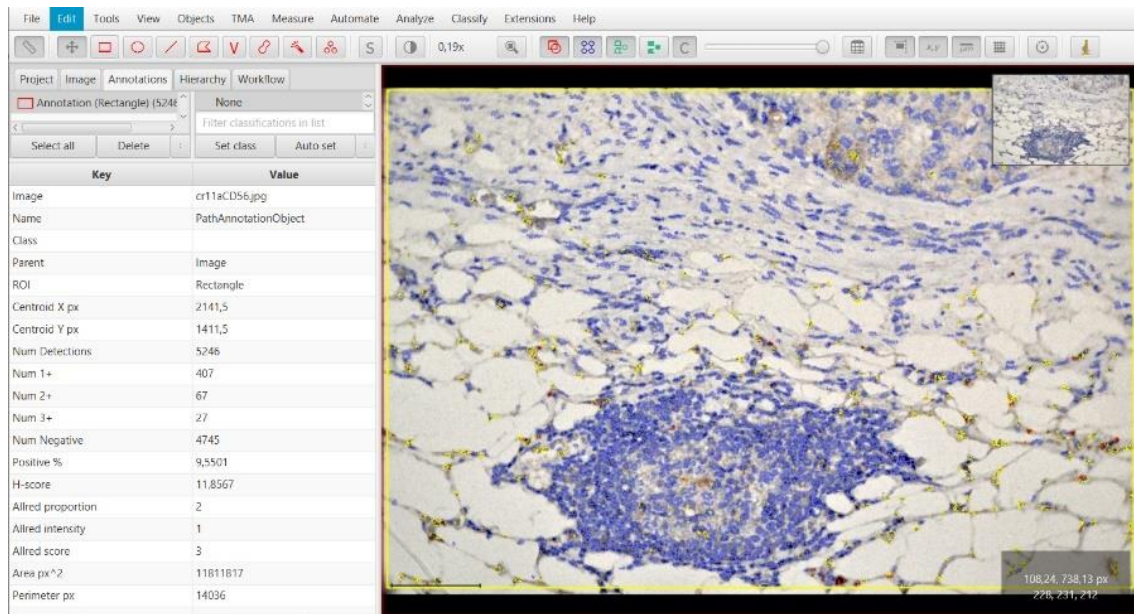
a)



b)



c)



d)

Рисунок 4.17 НК-лімфоцити біля інвазивного краю протокового раку грудної залози. Інтенсивність експресії НК-лімфоцитів на рівні 1+ а) – люмінальний підтип А; b – люмінальний В підтип /Ki-67 $\geq 20\%$; c – Her2/neu+; d – потрійний негативний молекулярний підтип. ІГХТ до CD56 (Clone 123C3, Thermo scientific). Зб. $\times 200$. Програмна платформа QuPath.

Нами також досліджено взаємозв'язок між лімфоцитарним інфільтратом та ступенем диференціації (G) пухлини як прогностичним показником інвазивного протокового раку грудної залози. Для всіх проаналізованих популяцій імунних клітин відсоток лімфоцитів, що інфільтрували пухлину, значно відрізнявся між ураженнями відповідного гістологічного ступеня за модифікованою схемою P. Scarff, H. Bloom і W. Richardson [238] (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

Морфометричні параметри Т-клітин, В-клітин та НК-клітин в інвазивному протоковому раку грудної залози різного ступеня диференціації; значення вимірювали як відсоток позитивно забарвлених імунних клітини до загальної кількості пухлинних клітин в полі зору

Ступінь диференціації (G)	Т-лімфоцити (CD3)		В-лімфоцити (CD20)		НК (CD56)	
	внутрішньо-пухлинні, %, p	інвазивний край, %, p	внутрішньо-пухлинні, %, p	інвазивний край, %, p	внутрішньо-пухлинні, %, p	інвазивний край, %, p
G1	4,27±0,12	17,38±0,21	2,15±0,13	11,57±0,39	0,91±0,05	4,93±0,15
G2	6,35±0,15	29,13±2,53	3,17±0,12	15,43±0,21	1,16±0,25 [#]	5,67±0,13
G3	17,89±0,37	46,35±2,76	5,27±0,34	21,17±0,35	2,13±0,24 ^{**}	7,23±0,18

Примітка 1. У всіх варіантах порівняння показників за видами лімфоцитів, внутрішньопухлинних, за інвазивним краєм встановлено достовірну різницю $p < 0,001$

Примітка 2. Практично у всіх варіантах порівняння показників за ступенем диференціації (G) встановлено достовірну різницю $p < 0,001$, окрім:

** $p < 0,01$ – різниця між показниками G2 і G3

$p > 0,05$ – різниця не доведена між показниками G1 і G2

У всіх варіантах порівняння показників за видами лімфоцитів, внутрішньопухлинних, за інвазивним краєм встановлено достовірну різницю $p < 0,001$. Відсоток інфільтратів Т- і В-клітин як всередині пухлинного вогнища, так і на інвазивному краї, а також НК-клітин на інвазивному краї був значно нижче при раку G1 і G2, ніж при раку G3 ($p < 0,01$). Що стосується внутрішньопухлинних НК-клітин, відмінності були виявлені тільки між ступенем диференціації G2 і G3 ($p < 0,01$), причому між G1 і G2 відмінності статистично не значущі, різниця не доведена між показниками ($p > 0,05$).

Нами також встановлені кореляційні зв'язки між лімфоцитарним інфільтратом та прогностичними параметрами категорії I, що включала інформацію про стадії класифікації (TNM), ступінь диференціації (G) та статус гормональних рецепторів. Так, у групі потрійно негативних пухлин нами встановлено достовірні помірні прямі кореляційні зв'язки між наявністю лімфогенних метастазів і лімфоцитарною інфільтрацією. Лімфоцити CD3-внутрішньопухлинні позитивно корелювали з N ($r = +0,52$; $p = 0,02$), CD3 на інвазивному краї пухлини також позитивно корелювали з N ($r = +0,65$; $p = 0,002$), внутрішньопухлинні CD20 і CD56 мали достовірні прямі майже ідентичні кореляції з N ($r = +0,56$; $p = 0,01$ і $r = +0,57$; $p = 0,01$) відповідно, як і CD20 і CD56 лімфоцити на інвазивному краї ($r = +0,68$; $p = 0,0009$ і $r = +0,66$; $p = 0,002$) відповідно. У потрійних негативних пухлинах без лімфогенних метастазів нами встановлено достовірні зворотні кореляційні зв'язки від помірного до високого ступеня між внутрішньопухлинними лімфоцитами CD3, CD20, CD56 і N0 ($r = -0,55$; $p = 0,01$, $r = -0,62$; $p = 0,004$ та $r = -0,66$; $p = 0,001$) відповідно, так і між лімфоцитами на інвазивному краї з N0 ($r = -0,69$; $p = 0,0007$, $r = -0,67$; $p = 0,001$ та $r = -0,75$; $p = 0,0001$) відповідно. Що стосується кореляційних зв'язків лімфоцитарного інфільтрату та ступеня диференціації пухлин, то нами встановлено помірний прямий зв'язок між CD3 лімфоцитами (внутрішньопухлинних і на інвазивному краї) і G ($r = +0,48$; $p = 0,03$ і $r = +0,45$; $p = 0,05$) відповідно і між CD56 на інвазивному краї та G ($r = +0,45$; $p = 0,05$).

Кореляційні зв'язки між CD20 лімфоцитами (внутрішньопухлинними і на інвазивному краї), CD56 внутрішньопухлинними і G були не достовірні ($p > 0,05$).

Пухлини грудної залози з Her2+ підтипом характеризувалися наявністю помірного і високого кореляційного зв'язку між лімфоцитарним інфільтратом і розміром пухлини, наявністю лімфогенних метастазів і ступенем диференціації пухлини. Так, нами встановлена висока кореляція між CD3 лімфоцитами (внутрішньопухлинними) та розміром пухлини (T) ($r = +0,72$; $p = 0,0004$), CD20 лімфоцитами (внутрішньопухлинними і на інвазивному краї) та розміром пухлини (T) ($r = +0,70$; $p = 0,0009$ та $r = +0,81$; $p = 0,0002$) відповідно і CD56 лімфоцитами (внутрішньопухлинними і на інвазивному краї) та розміром пухлини (T) ($r = +0,75$; $p = 0,00002$ та $r = +0,70$; $p = 0,0007$) відповідно. Помірний зв'язок встановлено між CD3 лімфоцитами на інвазивному краї і T ($r = +0,61$; $p = 0,01$). Аналогічно прямі позитивні кореляційні зв'язки нами встановлено між лімфоцитарним інфільтратом і наявністю лімфогенних метастазів. CD3 лімфоцити внутрішньопухлинні і на інвазивному краї пухлини достовірно позитивно корелювали з N ($r = +0,50$; $p = 0,03$, $r = +0,67$; $p = 0,001$), CD20 лімфоцити внутрішньопухлинні і на інвазивному краї пухлини також позитивно корелювали з N ($r = +0,69$; $p = 0,0009$, $r = +0,65$; $p = 0,002$), а вже CD56 лімфоцити внутрішньопухлинні і на інвазивному краї мали високу позитивну кореляцію з N ($r = +0,71$; $p = 0,0006$ і $r = +0,72$; $p = 0,0004$), відповідно. Що стосується кореляційних зв'язків зі ступенем диференціації пухлини, то нами встановлено достовірні середньої сили кореляції між CD3 лімфоцитами внутрішньопухлинними і G ($r = +0,44$; $p = 0,05$) і також G3 ($r = +0,43$; $p = 0,05$). Решта кореляційні зв'язки, встановлені нами між CD20, CD56 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї, CD3 лімфоцитами на інвазивному краї і ступенем диференціації пухлини, були позитивними і недостовірними.

Люмінальний A підтип карцином характеризувався наявністю прямих позитивних кореляційних зв'язків між лімфоцитарним інфільтратом і T, N і G.

Достовірні прямі позитивні кореляційні зв'язки середньої сили нами були встановлені між CD3 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і T ($r = +0,44$; $p = 0,03$ і $r = +0,35$; $p = 0,04$) відповідно; між CD20 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і T ($r = +0,50$; $p = 0,01$ і $r = +0,62$; $p = 0,0008$) відповідно; між CD56 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і T ($r = +0,62$; $p = 0,0008$ і $r = +0,66$; $p = 0,0003$) відповідно. Аналогічні кореляційні зв'язки нами були встановлені між лімфоцитарним інфільтратом і лімфогенними метастазами. Що стосується ступеня диференціації, то ми виявили високі і середньої сили кореляційні зв'язки між лімфоцитарним інфільтратом і G та G3. Нами встановлено достовірний високий прямий зв'язок між CD3 лімфоцитами (внутрішньопухлинними і на інвазивному краї) і G ($r = +0,74$; $p = 0,00001$ і $r = +0,77$; $p = 0,00008$) відповідно; помірний достовірний прямий зв'язок з G3 ($r = +0,39$; $p = 0,05$ і $r = +0,45$; $p = 0,02$); між CD20 лімфоцитами (внутрішньопухлинними і на інвазивному краї) і G ($r = +0,62$; $p = 0,0009$ і $r = +0,60$; $p = 0,001$) відповідно; помірний достовірний прямий зв'язок з G3 ($r = +0,47$; $p = 0,02$ і $r = +0,36$; $p = 0,05$); між CD56 лімфоцитами (внутрішньопухлинними і на інвазивному краї) і G ($r = +0,63$; $p = 0,0008$ і $r = +0,53$; $p = 0,01$) відповідно; і помірний достовірний прямий зв'язок з G3 ($r = +0,39$; $p = 0,05$ і $r = +0,38$; $p = 0,05$).

Для люмінального B підтипу були визначені наступні кореляційні зв'язки: внутрішньопухлинні лімфоцити і на інвазивному краї достовірно корелювали з розміром пухлини (T). Як і в групі люмінального A раку нами були встановлені достовірні прямі позитивні кореляційні зв'язки середньої сили між CD3 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і T ($r = +0,51$; $p = 0,004$ і $r = +0,62$; $p = 0,0004$) відповідно; між CD20 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і T ($r = +0,62$; $p = 0,0004$ і $r = +0,55$; $p = 0,001$) відповідно; між CD56 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і T ($r = +0,61$; $p = 0,0006$ і $r = +0,61$; $p = 0,0005$) відповідно.

Аналогічно, як і в люмінальному A раку, нами були встановлені кореляційні зв'язки з лімфогенними метастазами. Відповідно нами визначені

прямі позитивні кореляційні зв'язки середньої сили між CD3 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і N ($r = +0,56$; $p = 0,001$ і $r = +0,45$; $p = 0,01$) відповідно; між CD20 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і N ($r = +0,33$; $p = 0,05$ і $r = +0,42$; $p = 0,02$) відповідно; між CD56 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї і N ($r = +0,37$; $p = 0,04$ і $r = +0,36$; $p = 0,04$) відповідно. Кореляційні зв'язки лімфоцитарного інфільтрату та ступеня диференціації пухлин продемонстрували подібність з Her2+/neu підтипом, і показали низьку і недостовірну кореляцію між лімфоцитарним інфільтратом і G.

Таким чином, у даному дослідженні густий інфільтрат Т-клітин був пов'язаний з більш агресивними молекулярними підтипами раку грудної залози, зокрема потрійним негативним, HER2+нелюмінальним і люмінальним В /HER2+. Більше того, відмінності між пухлинами люмінального А підтипу і потрійного негативного стосувалися як внутрішньопухлинної інфільтрації, так і мікрооточення на інвазивному краї.

Результати проведеного дослідження також показали, що високий рівень інфільтрату В-клітин корелював з відсутністю експресії ER і PR і з базальним підтипом як на інвазивному краї, так і внутрішньопухлинно. Відповідно, спостерігалось збільшення В-клітин в нелюмінальних HER2+ і потрійному негативному підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. Люмінальні А і В підтипи були менш інфільтровані В-клітинами. Цікаво, що в дослідженні спостерігалися значно вищі значення щодо кількості В-клітин в пухлинах G3 ступеня диференціації порівняно з G2 і G1. Подібно до підгрупи Т-лімфоцитів, середня кількість В-лімфоцитів була вищою в люмінальному В / HER2 +, ніж в інших пухлинах люмінального підтипу.

Виявлено, що інфільтрат НК-клітин менше численний в люмінальних підтипах в порівнянні з потрійним негативним підтипом і HER2 + (позитивним). Більш висока внутрішньопухлинна інфільтрація НК-клітин, яка спостерігається при раку грудної залози, була пов'язана зі ступенем G3 і

ураженням лімфатичних вузлів. Також високий гістологічний клас (grade) був пов'язаний з більш численними НК-клітинами на інвазивному краї.

Висновки до Розділу 4

Результати проведеного дослідження дозволили нам проаналізувати експресію маркерів, що характеризують інвазивні властивості протокового раку грудної залози, їх зв'язок із морфологічними параметрами та молекулярним підтипом пухлини.

Встановлено, що низька експресія Е-кадгерину чи її відсутність асоціювалася з пухлинами Т3 стадії (≥ 5 см), 3 клінічною стадією (≥ 5 см, N2-3, G2-3), з G2 і G3 ступенями злоякісності, метастатичним статусом лімфатичних вузлів.

Експресія Е-кадгерину також асоціювалася з молекулярним типом інвазивної протокової карциноми грудної залози. Висока експресія Е-кадгерину була поширеною в ER-позитивних пухлинах люмінального А підтипу і визначалася у пацієток як пременопаузального, так і постменопаузального віку, що вказує на те, що ER-позитивна експресія може брати участь у регуляції експресії Е-кадгерину. Низька проліферативна активність клітин інвазивного протокового раку грудної залози люмінального підтипу супроводжується підвищенням адгезивних властивостей цих клітин за рахунок високого рівня експресії Е-кадгерину. Потрійний негативний рак асоціювався з достовірним переважанням пацієток з низькою і негативною експресією Е-кадгерину ($p=0,011$).

Окрім Е-кадгерину результати проведеного нами дослідження вказують на вагому роль СОХ-2 у пухлинній трансформації та перебігу онкологічного захворювання. У сукупності надмірна експресія СОХ-2 асоціювалася з агресивним підтипом з метастатичним потенціалом і залежала від гормонального статусу. Отримані результати вказують на те, що СОХ-2 може сприяти прогресії інвазивного протокового раку грудної залози і бути одним

із біомаркерів, який можна використовувати для прогнозування агресивності інвазивних протокових карцином грудної залози.

Отримані результати вказують на доцільність виділення СОХ-позитивних пухлин з надмірною експресією в окрему групу для оптимізації лікувальної тактики та використання можливостей таргетного контролю експресії ензиму. Крім того, СОХ-2 відіграє важливу роль у неоваскуляризації. За результатами проведеного дослідження найбільш значущими з прогностичної точки зору були атипові дилатовані судини у внутрішньопухлинній стромі, вистилка таких судин представлена хаотично розташованими ендотеліальними клітинами, які нашаровувалися одні на одних. Важливими були структури з частковою ендотеліальною вистилкою. Множинні структури з частковою ендотеліальною вистилкою частіше зустрічалися при помірному та високому ступені злоякісності пухлини (Grade 2-3), при негативному рецепторному статусі пухлини. Значна кількість структур з частковою ендотеліальною вистилкою спостерігалася при HER-2/neu позитивному та потрійному негативному РГЗ ($p < 0,05$).

Визначення особливостей лімфоїдного мікрооточення пухлини є важливим кроком на шляху до потенційного використання пухлино-інфільтруючих лімфоцитів як прогностичного і предиктивного біомаркера при раку грудної залози.

Результати дослідження залежали від субпопуляцій імунних клітин і їх розташування в пухлинній тканині. Щільність Т- і В-лімфоцитів була більшою внутрішньопухлинно і біля інвазивного краю в нелюмінальних підтипах в порівнянні з люмінальними А і В підтипами. Щільність внутрішньопухлинних Т-лімфоцитів була найвищою в потрійному негативному раку і значно достовірно переважала за щільність в люмінальному підтипі А.

В-клітинний інфільтрат на інвазивному краї був більш виразний в пухлинах нелюмінального підтипу. Але в порівнянні зі щільністю Т-лімфоцитів, В-клітинний інфільтрат був достовірно ($p < 0,01$) менш виражений в пухлинах як люмінального, так і нелюмінального підтипів. Найменша

щільність NK-клітин серед пухлино-інфільтруючих лімфоцитів виявлялася внутрішньопухлинно при люмінальних підтипах.

Отримані результати вказують на взаємозв'язок між лімфоїдним інфільтратом і ступенем диференціації при інвазивному протоковому раку грудної залози, особливо при його менш сприятливих молекулярних підтипах.

Відсоток інфільтратів Т- і В-клітин як всередині пухлинного вогнища, так і на інвазивному краї, а також NK-клітин на інвазивному краї був значно нижче при раку G1 і G2, ніж при раку G3 ($p < 0,01$). Що стосується внутрішньо пухлинних NK-клітин, відмінності були виявлені тільки між ступенем диференціації G2 і G3, причому між G1 і G2 відмінності статистично не значущі ($p > 0,05$).

Якісна й кількісна оцінка інтенсивності експресії Т- і В- та NK-клітин продемонструвала також різний ступінь експресії лімфоцитів в залежності від молекулярного підтипу і розташування інфільтрату. Люмінальний підтип А характеризувався достовірним переважанням помірної експресії (2+) CD3 як внутрішньопухлинно, так і на інвазивному краї пухлини ($p < 0,05$), в той час, як у люмінальному В та Her2+ підтипах інтенсивність експресії CD3 переважала на рівні 1+. Потрійно негативні пухлини характеризувалися вираженою експресією (3+) CD3 внутрішньопухлинно і на інвазивному краї пухлини у всіх досліджуваних випадках.

У розділі 5 нами буде представлено статистичний аналіз з обчисленням коефіцієнта рангової кореляції Спірмена між експресією маркерів, що характеризують інвазивні властивості протокового раку грудної залози, включаючи Е-кадгерин, COX-2, CD31, лімфоїдну запальну інфільтрацію, їх зв'язок із морфологічними параметрами та молекулярним підтипом пухлини.

Результати дослідження, викладені у Розділі 4, опубліковані в наступних наукових працях:

1. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози. Український журнал

- медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu). 2021; Том 6, № 6 (34): 44–56. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.06.044>.
2. Volos LI, Dudash AP. Features of E-cadherin expression in the triple negative and luminal “A” phenotypes invasive ductal breast cancer. *Azerbaijan Medical Journal Azerbaijan Medical Journal Scopus: Q4*. 2022; 3: 125–132. <https://doi.org/10.34921/amj.2022.3.020>.
 3. Volos LI, Dudash AP. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer. *Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland)*. 2022; 50(1): 269-280. DOI: <https://doi.org/10.23856/5032>
 4. Volos LI, Dudash AP. Tumor-infiltrating lymphocytes in nonluminal invasive ductal breast carcinoma. *Azerbaijan Medical Journal (Scopus: Q4)*. 2022; 1: 131–137. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.021>
 5. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості експресії СОХ-2 в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. *Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu)*. 2022; Том 7, № 1 (35): 68-78. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.01.068>
 6. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості експресії молекул клітинної адгезії Е-кадгерину в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. *Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu)*. 2022; Том 7, № 3 (37): 52–64. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.03.052>
 7. Volos L, Dudash A. The role of overexpression of Cyclooxygenase-2 in the prognosis of invasive ductal breast cancer. *International scientific conference "Medicine and health care in modern society: actual problems and modern aspects" February 26-27, 2021. Lublin, Poland: Izdevnieciba “Baltija Publishing”, 2021; 49-52.*
 8. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. Lymphoid environment in Luminal A subtype invasive ductal breast carcinoma. *17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide, 17–21 March 2021. The Breast (Scopus,*

- Web of Science, Q1). 2021; Vol. 56 (1S): S27. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(21\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(21)00112-0)
9. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. E-cadherin expression in triple-negative invasive ductal breast carcinoma. 17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide, 17–21 March 2021. *The Breast* (Scopus, Web of Science, Q1). 2021; Vol. 56 (1S): S27-28. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(21\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(21)00113-2)
 10. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. Lymphoid Environment in Triple-Negative Invasive Ductal Breast Carcinoma. International scientific and practical conference "Scientific progress of medicine and pharmacy of the EU countries", April 23-24 2021. Częstochowa, Poland: "Baltija Publishing", 2021; 26-30.

РОЗДІЛ 5

ПРОГНОСТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНИХ ТА ІМУНОГІСТОХІМІЧНИХ ПОКАЗНИКІВ ПРИ ІНФІЛЬТРАТИВНОМУ ПРОТОКОВОМУ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

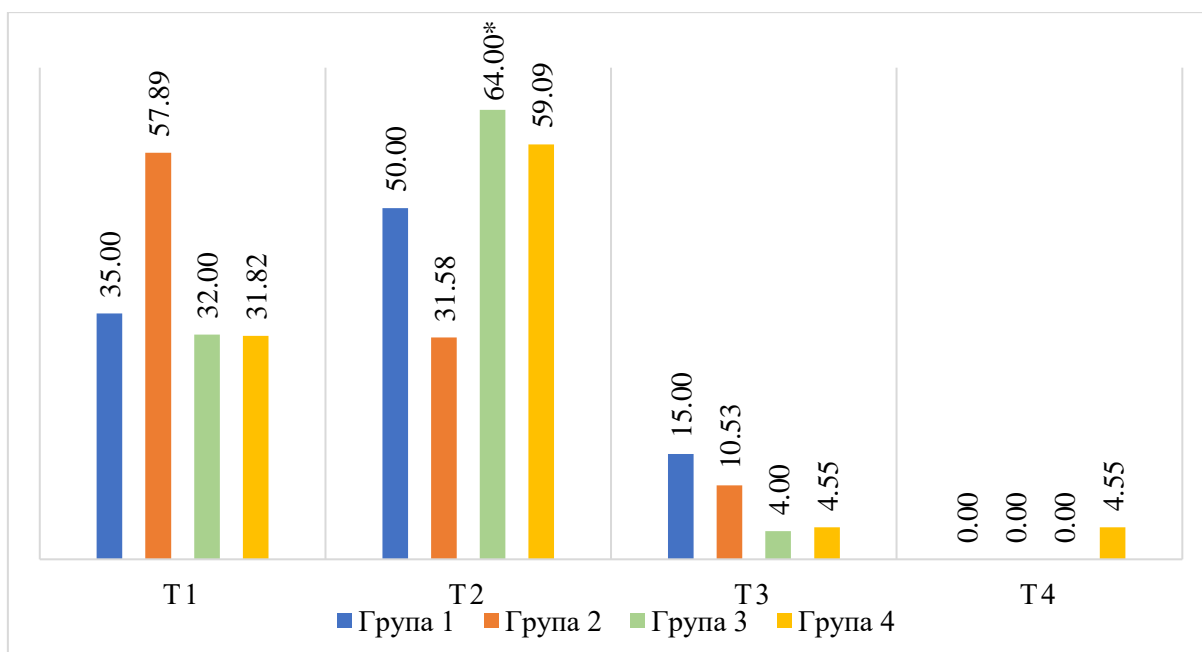
У даному розділі нами представлено порівняльну характеристику прогностичних змінних та кореляційні і поєднані взаємозв'язки між ними та відомими прогностичними чинниками, встановлені у 86 випадках інвазивного протокового раку грудної залози, зокрема у 25 випадках люмінального А підтипу, 22 випадках люмінального В підтипу, 19 випадках Her2/neu+ підтипу і 20 випадках потрійного негативного раку.

Порівняння показників розміру пухлин (Т) у досліджуваних групах дозволило встановити різницю між групами і переважання тої чи іншої стадії, характерної для певного підтипу пухлини. Так, пухлини розміром Т1 (≤ 2 см) найбільше діагностувалися в групі Her2/neu+ підтипу і склали 57,89%, що було в 1,7 рази більше, ніж у групі потрійного негативного раку і в 1,8 рази більше, ніж у групах люмінального А і В підтипів. Такий найбільший відсоток пухлин Her2/neu+ підтипу, діагностований у стадії Т1, можна пояснити молодим віком пацієток, які частіше зверталися в клініку в разі раннього виявлення ними будь-яких змін у грудних залозах. Пухлини розміром Т2 (>2 см, <5 см) переважали в групі люмінального А підтипу, середній вік пацієток якої був 56,3 року, і склали 64%, що було у 2 рази більше, порівняно з групою Her2/neu+ (31,58%). Пухлини з потрійним негативним і люмінальним В підтипами і розміром Т2 також переважали у своїх групах і склали 50% і 59,09% відповідно. Пухлин розміром Т3 (≥ 5 см) було найменше серед всіх підтипів, але в групі Т3 переважали потрійно негативні пухлини (15%), яких було в 3,75 рази більше, ніж люмінальних А пухлин (4%), в 3,3 рази більше люмінальних В (4,55%) і в 1,4 рази більше, ніж пухлин Her2/neu+ підтипу (10,53%). Великі за розміром пухлини Т4 належали тільки люмінальному В

підтипу. Нами також доведена достовірна різниця ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп (рис. 5.1).

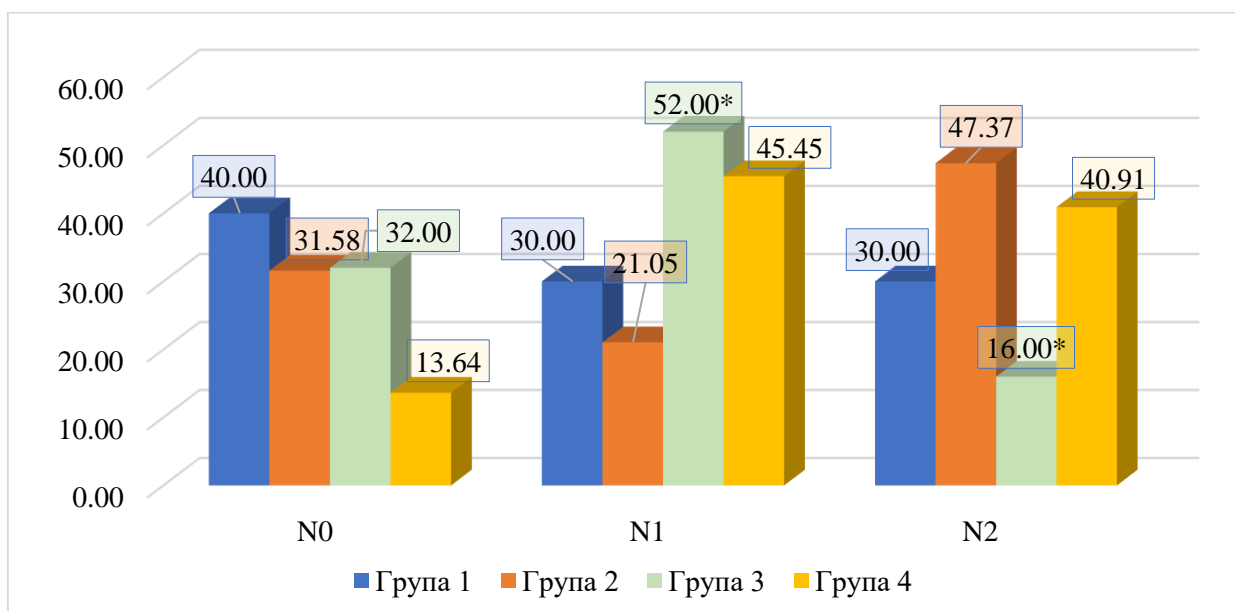
Порівняння показників регіонарних метастазів (N) у досліджуваних групах (%) показало практично однакову відсутність метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N0) у відсотковому значенні у всіх підтипах (40% - потрійний негативний рак, 31,58% - Her2/neu+ підтип, 32% - люмінальний A підтип), і діагностикою цих пухлин у стадії T1. Наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів (N1) була найбільшою в люмінальному A підтипі (52%), що можна пояснити пізнім звертанням пацієток старшого віку і наявною пухлиною в стадії T2. Ураження віддалених лімфатичних вузлів переважало у групах Her2/neu+ підтипу (47,37%), люмінального B (40,91%) і потрійного негативного (30%) раків, що пояснюється агресивністю підтипу. Достовірна різниця ($p < 0,05$) доведена між показниками 2 (Her2/neu+ підтип) та 3 груп (люмінальний A підтип) (рис. 5.2).

Нами проведене порівняння показників ступеня диференціації пухлин (G) у досліджуваних групах (%). Ступінь злоякісності (G) є оцінкою рівня диференціювання тканини (виразність тубулярних структур і ядерний поліморфізм) і проліферативної активності (мітотичний індекс), що суб'єктивно відображають ступінь агресії пухлини. Ступінь диференціювання пухлини багато в чому визначає перебіг пухлинного процесу: високо диференційовані пухлини характеризуються меншою проліферативною і метастатичною активністю, в той час як низько диференційовані мають більш агресивний потенціал і вимагають активної терапії. Ступінь диференціації G1 характеризувався переважанням пухлин люмінального A підтипу, які склали 20% і яких в 4-5 разів було більше, ніж Her2/neu+ підтипу і люмінального B. Нами не було діагностовано жодного випадку пухлини потрійного негативного підтипу зі ступенем диференціації G1.



Примітка. * – доведена різниця ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп

Рисунок 5.1 Порівняння показників розміру пухлин (Т) у досліджуваних групах (%). 1 група – потрійний негативний підтип, 2 група - Her2/neu+ підтип, 3 група – люмінальний А підтип, 4 група – люмінальний В підтип.



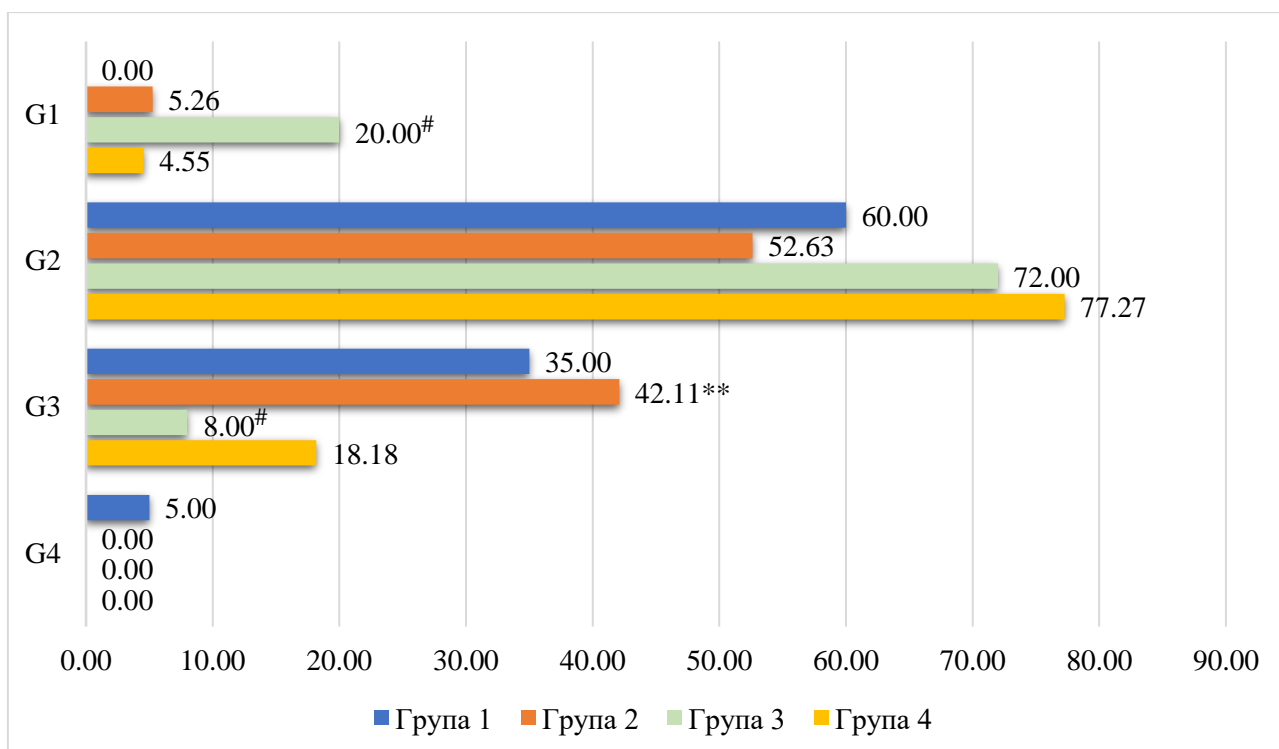
Примітка. * – доведена різниця ($p < 0,05$) між показниками 2 та 3 груп

Рисунок 5.2 Порівняння показників регіонарних метастазів (N) у досліджуваних групах (%). 1 група – потрійний негативний підтип, 2 група - Her2/neu+ підтип, 3 група – люмінальний А підтип, 4 група – люмінальний В підтип.

Помірно диференційовані пухлини G2 склали найбільший відсоток у досліджуваних групах (від 52,63% до 77,27%). Низько диференційовані пухлини G3 переважали у випадках Her2/neu+ підтипу (42,11%) і потрійного негативного підтипу (35%). Найменший відсоток пухлин G3 ступеня диференціювання діагностувався у випадках люмінального A підтипу (8%). Слід звернути увагу на 5% пухлин потрійного негативного підтипу зі ступенем диференціювання G4. Важливими є доведена достовірна різниця ($p < 0,01$) між показниками 2 групи (Her2/neu+ підтипу) та 3 групи (люмінального A підтипу), і також доведена достовірна різниця ($p < 0,05$) між показниками 1 групи (потрійного негативного підтипу) та 3 групи (люмінального A підтипу) (рис. 5.3).

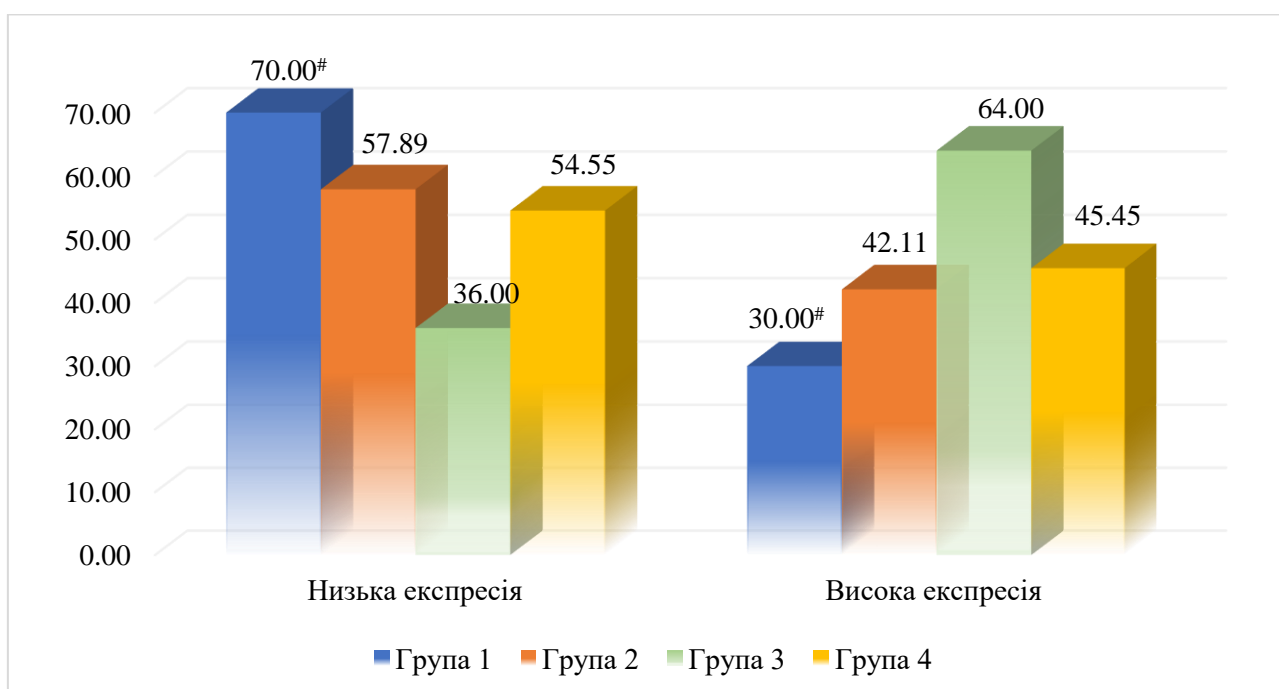
Порівняння рівня експресії E-кадгерину (%) дозволило нам проаналізувати його імунореактивність в різних молекулярних підтипах карцином грудної залози, що надасть додаткову інформацію про біологічну поведінку пухлини, так як епітеліальний кадгерин відіграє головну роль у процесі клітинної адгезії, є потужним супресором інвазії та метастазування (рис. 5.4).

Вибіркова відсутність E-кадгерину може спричинити дедиференціацію та інвазивність у карциномах людини, що підтверджує його роль в якості пухлинного супресора. Висока експресія E-кадгерину була поширеною в ER-позитивних пухлинах, зокрема у хворих з люмінальним A підтипом карциноми, і склала 64%. У пацієток з люмінальним B підтипом високий рівень експресії виявлявся у менше половини випадків (45,45%). Низький рівень експресії спостерігався у 70% випадків потрійного негативного раку, в 57,89% випадків Her2/neu+ підтипу і в 54,55% випадків люмінального B підтипу (рис. 5.4). Крім того, нами доведена достовірна різниця ($p < 0,05$) між показниками 1 групи (потрійний негативний підтип) та 3 групи (люмінальний A підтип).



Примітки. ** – доведена різниця ($p < 0,01$) між показниками 2 та 3 груп
– доведена різниця ($p < 0,05$) між показниками 1 та 3 груп

Рисунок 5.3 Порівняння показників ступеню диференціації пухлин (G) у досліджуваних групах (%)



Примітка. # – доведена різниця ($p < 0,05$) між показниками 1 та 3 груп

Рисунок 5.4 Порівняння рівня експресії E-кадгеринів у досліджуваних групах (%)

Нами також проведено порівняння експресії COX-2 з рецепторним статусом пухлин і молекулярно-генетичним підтипом карцином [273, 274]. Оцінка експресії COX-2 є важливим прогностичним чинником перебігу різних молекулярних підтипів раку грудної залози, як і доцільність виділення COX-позитивних пухлин в окрему групу для оптимізації лікувальної тактики та використання можливостей таргетного контролю експресії ензиму. Експресія COX-2 пов'язана з неоваскуляризацією, пригніченням апоптозу, стимуляцією росту клітин та пригніченням імунітету.

Надмірна експресія COX-2 була більш поширеною в ER-негативних пухлинах, зокрема у 75% випадків потрійного негативного підтипу карцином і в 73,68% випадків з Her2/neu+ підтипом інвазивного протокового раку грудної залози. А низька експресія COX-2 виявлялася у пухлинах люмінального А підтипу, причому доведена достовірна різниця ($p < 0,05$) показників 3 групи з 4 групою і доведена достовірна різниця ($p < 0,01$) показників 3 групи з іншими групами (1 і 2) (рис. 5.5).

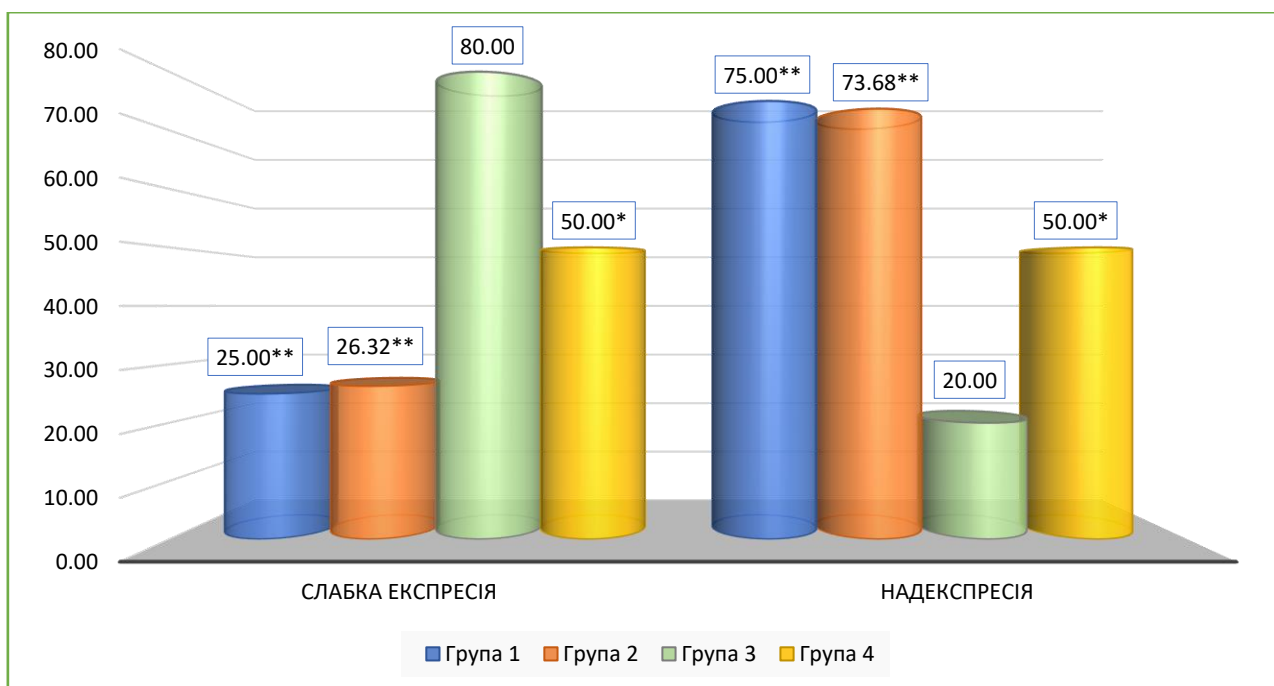
Морфологічна та імуногістохімічна верифікація пухлинних судин і порівняння частоти їх наявності в різних молекулярних підтипах карциноми має прогностичне значення, так як ангиогенез є одним з ключових чинників пухлинної прогресії, пов'язаний з ростом та метастазуванням злоякісних новоутворень. У даний час його оцінка розглядається як важливий маркер прогнозу захворювання та чутливості до протипухлинної терапії. Комплексне вивчення морфологічних особливостей різних типів мікросудин у пухлині та їх кореляцій з клініко-морфологічними та молекулярно-біологічними факторами прогнозу захворювання є важливим і не викликає сумнівів.

Нами проведено порівняння частоти наявності атипових дилатованих капілярів у досліджуваних групах (%). Атипові дилатовані капіляри діагностувалися у внутрішньопухлинній стромі. Вистилка судин представлена хаотично розташованими ендотеліальними клітинами, які нашаровуються одна на одну. Атипові дилатовані капіляри діагностувалися як множинні або поодинокі, або не визначалися зовсім. Множинні дилатовані капіляри

переважали у пухлинах потрійного негативного підтипу і діагностувалися у 40% випадків, а також у пухлинах з Her2/neu+ підтипом (26,32%). У групі люмінального А підтипу множинні дилатовані капіляри діагностувалися в поодиноких випадках, а в групі люмінального В підтипу таких капілярів не було. Одинокі дилатовані капіляри зустрічалися у всіх групах, проте у 72,73% вони діагностувалися у люмінальному В підтипі і в 63,16% - у пухлинах з Her2/neu+ підтипом. По 40% діагностувалися одинокі дилатовані капіляри в люмінальному А підтипі і в потрійному негативному. Потрібно наголосити, що люмінальний А підтип характеризувався відсутністю у 44% атипичних дилатованих капілярів, чого не можна було сказати про інші підтипи карциноми. Нами доведена достовірна різниця ($p < 0,05$) показників 2 групи (потрійного негативного раку) і 3 групи (люмінального А підтипу), а також показників 4 групи з іншими групами (рис. 5.6).

При морфологічному дослідженні поряд з нормальними та дилатованими капілярами було виявлено порожнисті округлої та овальної форми структури з частковою ендотеліальною вистилкою. Такі капіляри з частковою ендотеліальною вистилкою були множинними або поодинокими, в деяких випадках відсутніми. У більшості випадків – це були поодинокі капіляри, що зустрічалися найбільше в люмінальному В підтипі (68,18%), потрійному негативному підтипі (55%), у пухлинах з Her2/neu+ підтипом (52,63%).

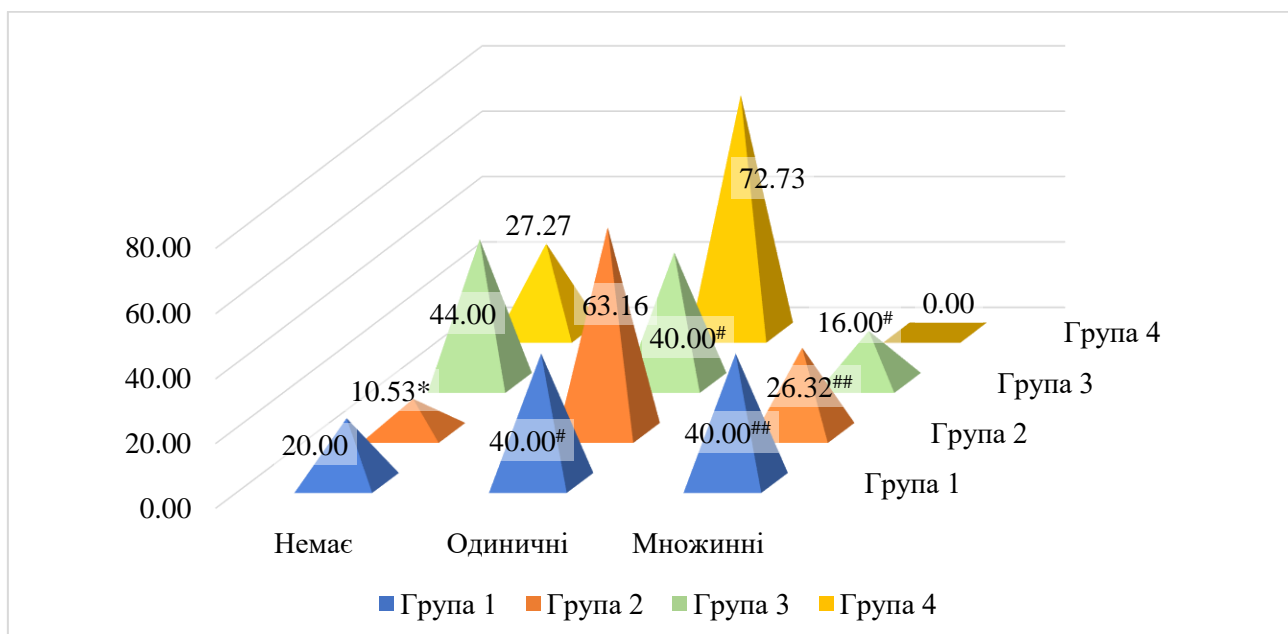
У люмінальному А підтипі їх було найменше в порівнянні з іншими групами (40%), а в 44% вони були відсутніми. Множинні капіляри з частковою ендотеліальною вистилкою зустрічалися рідко, в основному в пухлинах потрійного негативного підтипу (20%). Також нами доведена достовірна різниця ($p < 0,05$) показників 4 групи (люмінального В підтипу) з іншими групами (рис. 5.7).



Примітка. * – доведена різниця ($p < 0,05$) показників 3 групи з 4 групою

** – доведена різниця ($p < 0,01$) показників 3 групи з іншими групами

Рисунок 5.5 Порівняння рівня експресії COX-2 у досліджуваних групах (%)

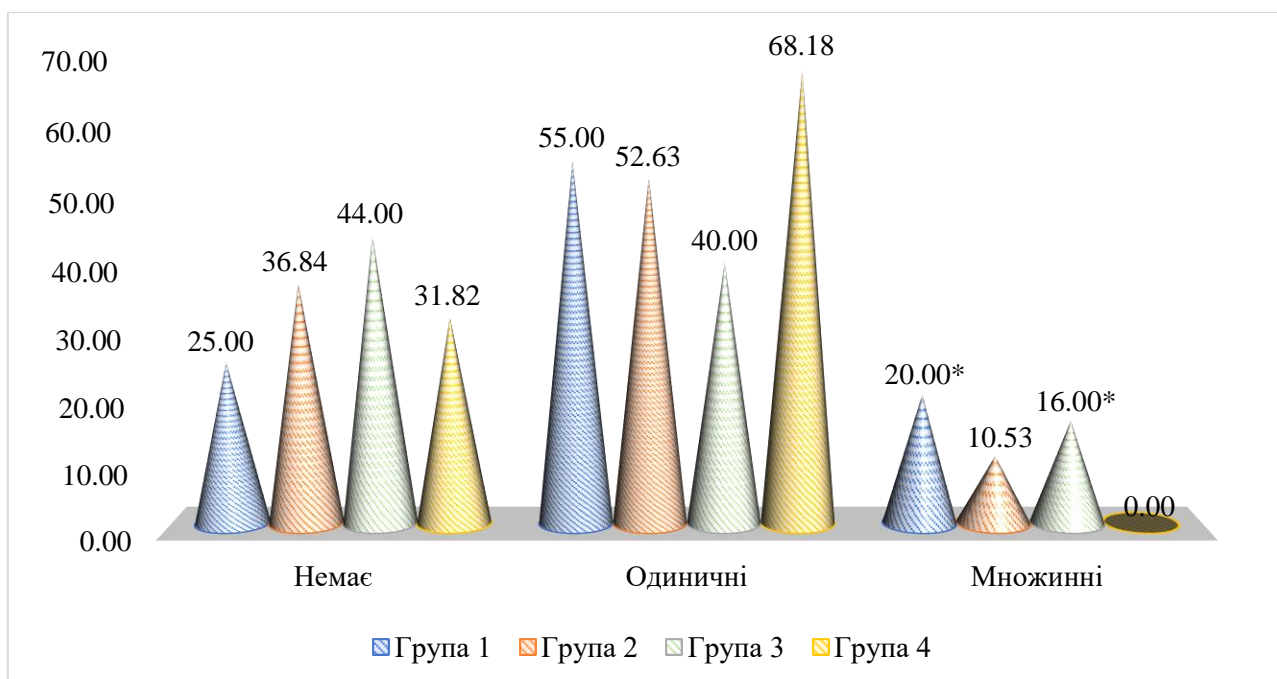


Примітки. * – доведена різниця ($p < 0,05$) показників 2 і 3 груп

– доведена різниця ($p < 0,05$) показників 4 групи з іншими групами

– доведена різниця ($p < 0,01$) показників 4 групи з іншими групами

Рисунок 5.6 Порівняння частоти наявності атипових дилатованих капілярів у досліджуваних групах (%)



Примітка. * – доведена різниця ($p < 0,05$) показників 4 групи з іншими групами

Рисунок 5.7 Порівняння наявності структур з частковою ендотеліальною вистилкою у досліджуваних групах (%)

На сьогоднішній день інфільтрат імунних клітин став новим прогностичним біомаркером раку грудної залози. Запальний інфільтрат в мікрооточенні пухлини складається з безлічі популяцій клітин, які чинять різноманітний вплив на пухлинні клітини, починаючи від стимулювання розвитку пухлини або пригнічення її росту. Взаємодія пухлинних та імунних клітин відбувається в результаті прямого міжклітинного контакту або опосередкованого молекулами, що походять з лімфоїдних клітин (рецептори, цитокіни і хемокіни).

Нами досліджувалось пухлинне мікрооточення, що включає імунокомпетентні клітини, зокрема Т- і В-лімфоцити, інфільтруючі пухлину, а також природні кілери (NK). Активність субпопуляцій Т-клітин варіюється від цитотоксичності щодо злоякісних клітин і посилення протипухлинної відповіді до індукції імунотолерантності і пригнічення імунітету [272]. Інфільтруючі пухлину В-лімфоцити є джерелом протипухлинних антитіл

[112]. В той час, NK-клітини, подібно до Т-клітин, схильні гальмувати ріст пухлини та її поширення, чим і пояснюється їх цитотоксична активність [117].

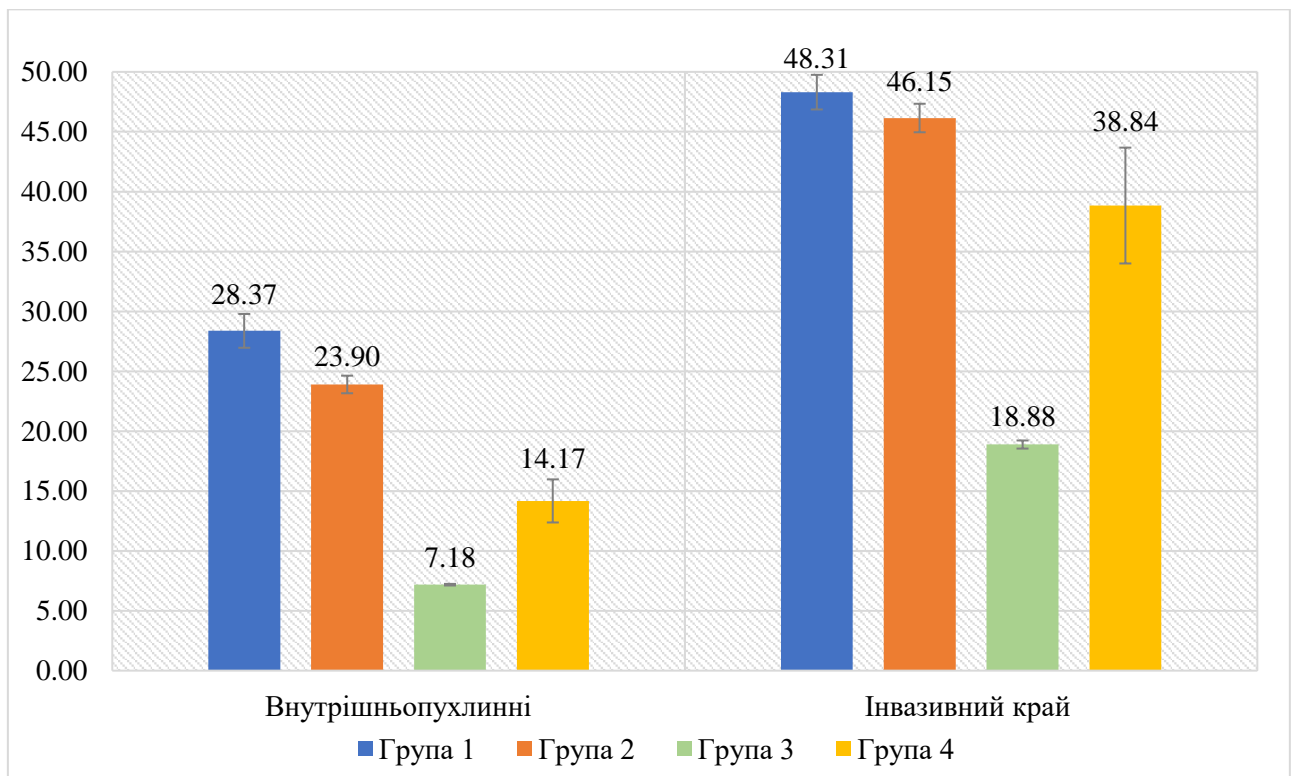
Порівняння середніх значень ($M \pm SD$, %) інфільтруючих пухлину CD3-лімфоцитів у досліджуваних групах показало достовірне переважання ($p < 0,001$) Т-лімфоцитів на інвазивному краї пухлини, причому найвищий відсоток визначено в групі потрійного негативного підтипу (48,31%) і в пухлинах з Her2/neu+ підтипом (46,15%). Люмінальні підтипи характеризувалися нижчим відсотком, особливо люмінальний А підтип (18,88%). Порівняння середніх значень із внутрішньопухлинними CD3-лімфоцитами в кожній групі показало значне переважання на інвазивному краї. Так, у групі потрійного негативного РГЗ CD3-лімфоцити в 1,7 раза переважали за внутрішньопухлинні, у групі Her2/neu+ підтипу – в 1,9 раза, у групі люмінального А підтипу – в 2,6 раза, у групі люмінального В підтипу – в 2,7 раза.

При порівнянні середніх значень внутрішньопухлинних інфільтруючих пухлину CD3-лімфоцитів у досліджуваних групах звертає на себе увагу переважання Т-лімфоцитів у групі потрійного негативного підтипу порівняно з люмінальним А підтипом у 3,9 раза і в 1,9 раза переважання в групі люмінального В підтипу в порівнянні з люмінальним А підтипом, причому доведена достовірна різниця ($p < 0,001$) між показниками усіх груп (рис. 5.8).

Порівняння середніх значень ($M \pm SD$, %) CD20 (внутрішньопухлинних і на інвазивному краї) у досліджуваних групах показало аналогічну картину достовірного переважання ($p < 0,001$) В-лімфоцитів на інвазивному краї пухлини. Найбільше середнє значення встановлено у групі Her2/neu+ підтипу – 25,83%, у групі потрійно негативного підтипу – 20,31%, найменше у групі люмінального А підтипу – 6,70%. Внутрішньопухлинних CD20 лімфоцитів було в середньому в 3-5 разів менше, ніж на інвазивному краї (рис. 5.9).

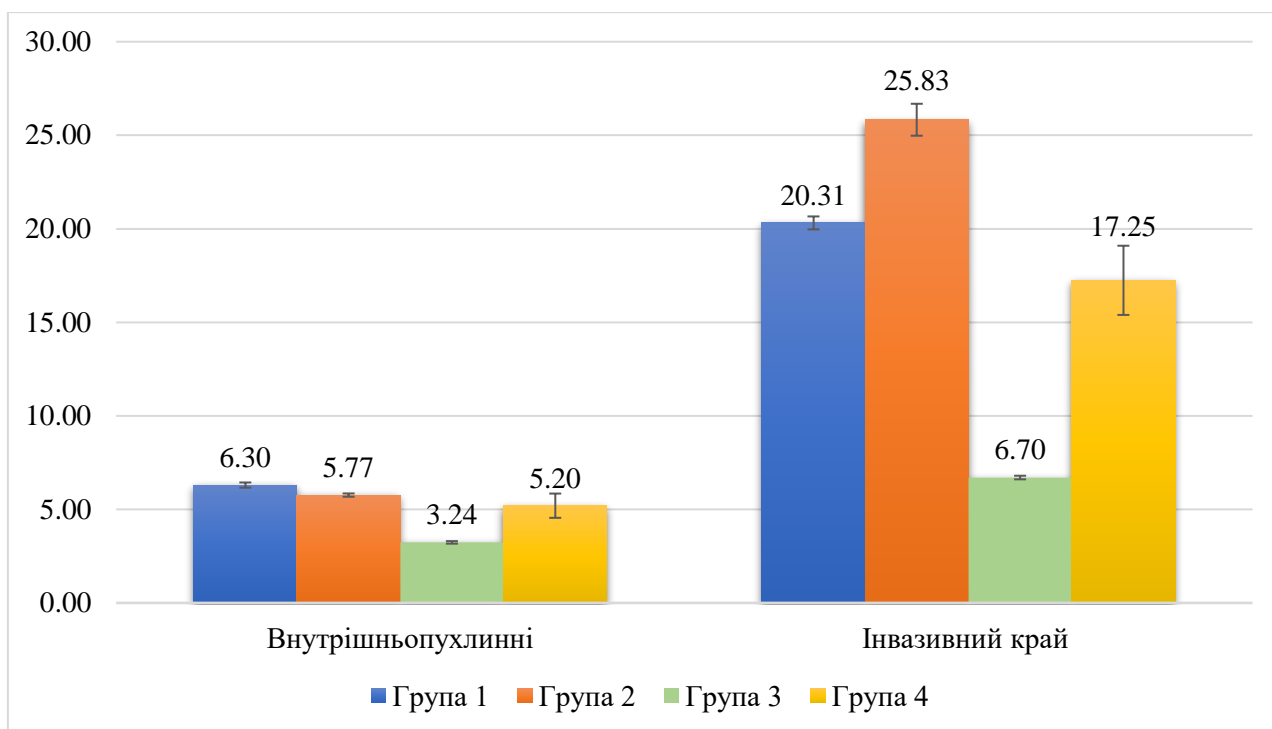
При порівнянні значень CD20 з CD3 лімфоцитами у всіх досліджуваних групах було встановлено достовірне значне переважання Т-лімфоцитів (внутрішньопухлинних і на інвазивному краї).

Порівняння середніх значень ($M \pm SD$, %) CD56-лімфоцитів у досліджуваних групах показало нанижчі показники натуральних кілерів, порівняно з CD3 і CD20 лімфоцитами, як в середині пухлини, так і на інвазивному краї. На інвазивному краї CD56-лімфоцитів було найбільше у групі потрійно негативного раку (7,52%), найменше – у групі люмінального А підтипу (4,40%). Внутрішньопухлинні CD56-лімфоцити переважали також у групі потрійного негативного раку (2,42%), найменше їх було у групі люмінального А раку (0,95%) (рис. 5.10). Нами була доведена достовірна різниця ($p < 0,001$) між показниками усіх груп.



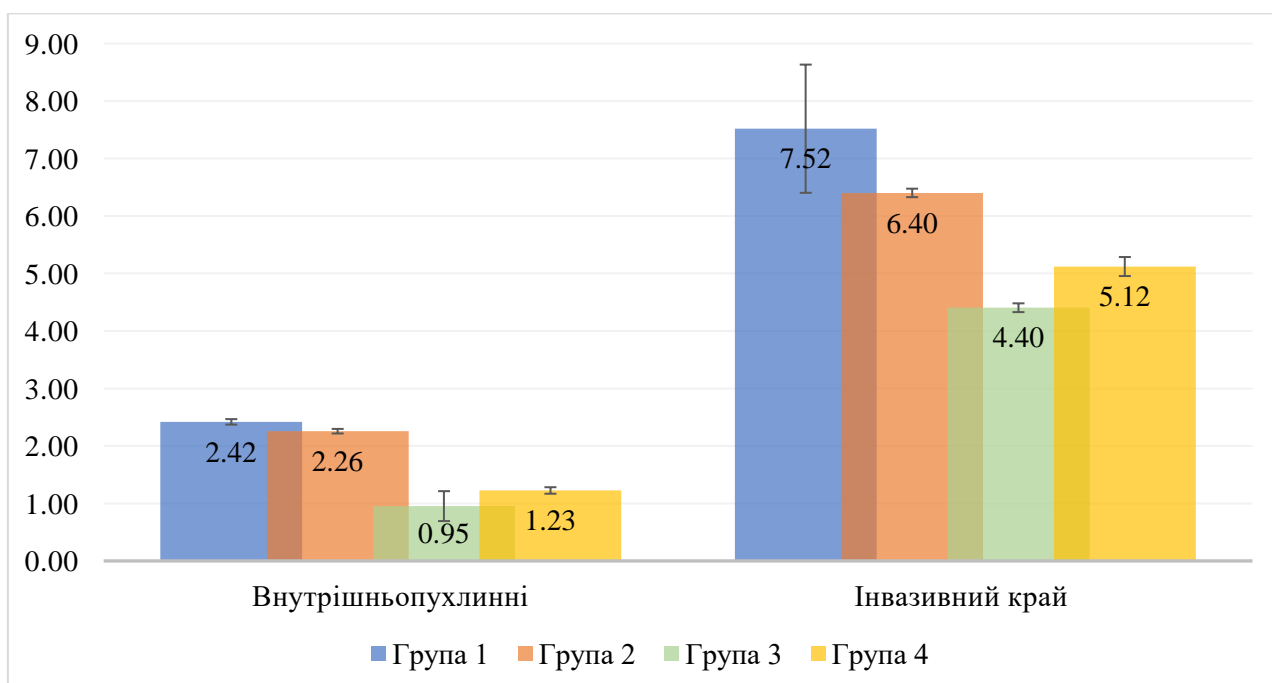
Примітка. Доведена різниця ($p < 0,001$) між показниками усіх груп

Рисунок 5.8 Порівняння середніх значень ($M \pm SD$, %) CD3 лімфоцитів у досліджуваних групах



Примітка. Доведена різниця ($p < 0,001$) між показниками усіх груп

Рисунок 5.9 Порівняння середніх значень ($M \pm SD$, %) різних типів CD20 у досліджуваних групах



Примітка. Доведена різниця ($p < 0,001$) між показниками усіх груп

Рисунок 5.10 Порівняння середніх значень ($M \pm SD$, %) різних типів CD56 у досліджуваних групах

У результаті дослідження кореляційних та поєднаних взаємозв'язків нами визначена клінічна значущість оцінки пухлинних судин. Було встановлено, що наявність дилатованих та атипових дилатованих капілярів, структур з частковою ендотеліальною вистилкою корелювала з прогностичними параметрами категорії III, що включають E-кадгерин, циклооксигеназу-2 (COX-2), розподіл інфільтруючих пухлину лімфоцитів, щільність та інтенсивність їх експресії, морфологічні структурні особливості пухлини.

Кореляційні зв'язки між наявністю дилатованих капілярів та прогностичними параметрами інфільтративного протокового РГЗ продемонстрували наступне: виявлено достовірний прямий помірний кореляційний зв'язок з низькою експресією E-кадгерину ($r = +0,48$; $p = 0,000002$), з надекспресією COX-2 ($r = +0,40$; $p = 0,0001$), з підвищеною інфільтрацією лімфоцитів на інвазивному краї ($r = +0,30$; $p = 0,004$), з наявністю одного типу морфологічних структур в пухлині ($r = +0,48$; $p = 0,000002$). Нами також встановлено достовірні прямі від помірного до високого кореляційні зв'язки між атиповими дилатованими капілярами і низькою експресією E-кадгерину ($r = +0,49$; $p = 0,0000002$), з надекспресією COX-2 ($r = +0,48$; $p = 0,0000002$), з підвищеною інфільтрацією внутрішньопухлинних лімфоцитів і на інвазивному краї: CD3 ($r = +0,43$; $p = 0,00003$ і $r = +0,48$; $p = 0,0000003$, відповідно), CD20 ($r = +0,44$; $p = 0,00002$ і $r = +0,43$; $p = 0,00003$, відповідно), CD56 ($r = +0,43$; $p = 0,00002$ і $r = +0,43$; $p = 0,00004$, відповідно), зі структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r = +0,82$; $p = 1,15717737200229E-21$), з наявністю одного типу морфологічних структур в пухлині $r = +0,34$; $p = 0,001$). Структури з частковою ендотеліальною вистилкою також помірно позитивно корелювали з низькою експресією E-кадгерину ($r = +0,47$; $p = 0,0000005$), з надекспресією COX-2 ($r = +0,49$; $p = 0,000002$), з підвищеною інфільтрацією CD3 лімфоцитів на інвазивному краї ($r = +0,31$; $p = 0,003$).

Нами також встановлені кореляційні зв'язки пухлинних судин (дилатовані, атипові дилатовані капіляри, структури з частковою

ендотеліальною вистилкою) з прогностичними параметрами всередині кожного молекулярного підтипу.

У випадках протокової інвазивної карциноми потрійного негативного молекулярного підтипу було встановлено пряму помірну і високу кореляцію між дилатованими капілярами і низькою експресією пухлинними клітинами Е-кадгерину ($r = +0,48$; $p = 0,03$), надекспресією COX-2 ($r = +0,51$; $p = 0,02$), значною інфільтрацією як внутрішньопухлинних лімфоцитів, так і на інвазивному краї: CD3 ($r = +0,68$; $p = 0,0009$ і $r = +0,62$; $p = 0,003$, відповідно), CD20 ($r = +0,62$; $p = 0,003$ і $r = +0,72$; $p = 0,0003$, відповідно), CD56 ($r = +0,62$; $p = 0,003$ і $r = +0,66$; $p = 0,001$, відповідно), структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r = +0,64$; $p = 0,02$). Аналогічно нами встановлено достовірний прямий помірний кореляційний зв'язок між атипovими дилатованими капілярами і низькою експресією Е-кадгерину ($r = +0,45$; $p = 0,05$), надекспресією COX-2 ($r = +0,60$; $p = 0,004$) і високий кореляційний зв'язок – з лімфоцитарною інфільтрацією всередині пухлини і на інвазивному краї: CD3 ($r = +0,76$; $p = 0,0001$ і $r = +0,72$; $p = 0,0003$, відповідно) (рис. 5.11, 5.12), CD20 ($r = +0,75$; $p = 0,0001$ і $r = +0,83$; $p = 0,0000004$, відповідно), CD56 ($r = +0,73$; $p = 0,0002$ і $r = +0,75$; $p = 0,0003$, відповідно).

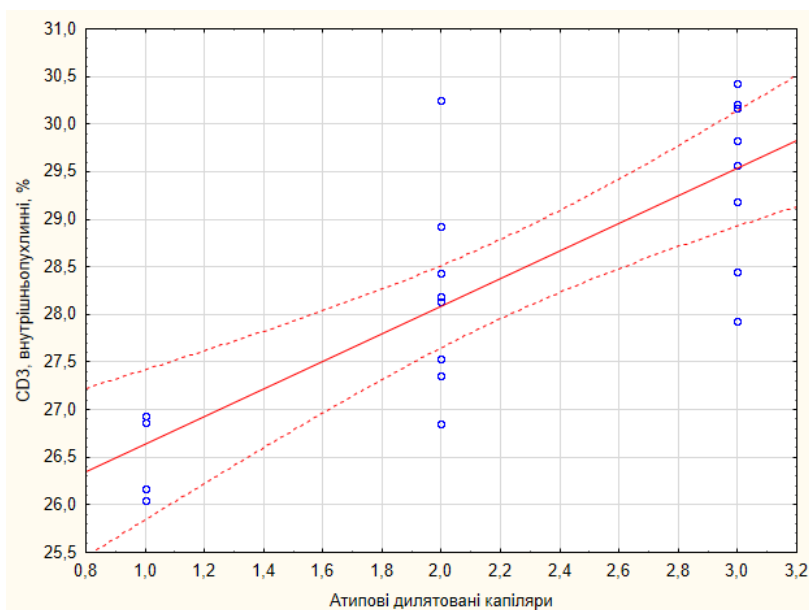


Рисунок 5. 11 Кореляційний взаємозв'язок між наявністю атипovих дилатованих капілярів та внутрішньопухлинних CD3 ($r = +0,76$; $p = 0,0001$).

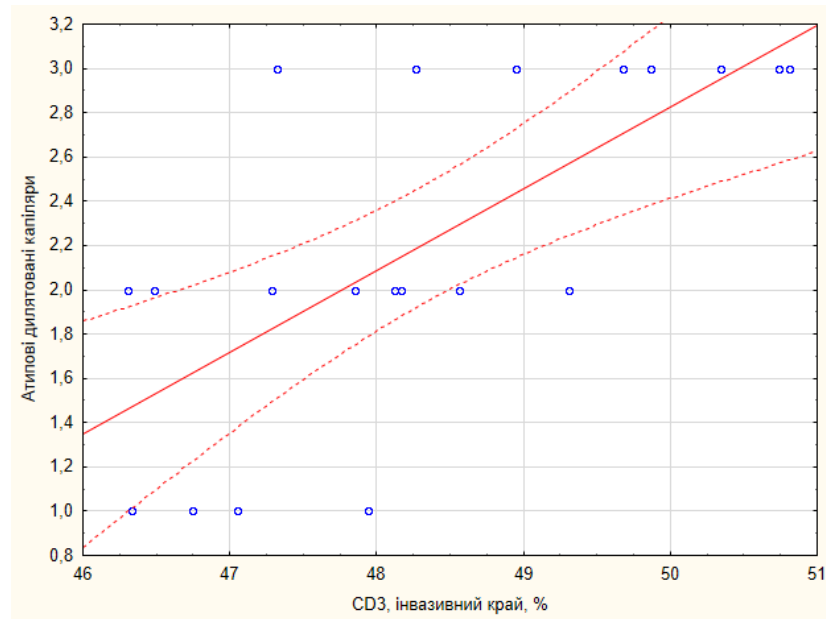


Рисунок 5. 12 Кореляційний взаємозв'язок між наявністю атипових дилатованих капілярів та CD3 лімфоцитів на інвазивному краї ($r=+0,72$; $p=0,0003$).

Нами встановлено достовірні помірні прямі кореляційні зв'язки між наявністю лімфогенних метастазів і лімфоцитарною інфільтрацією (рис. 5.13, 5.14).

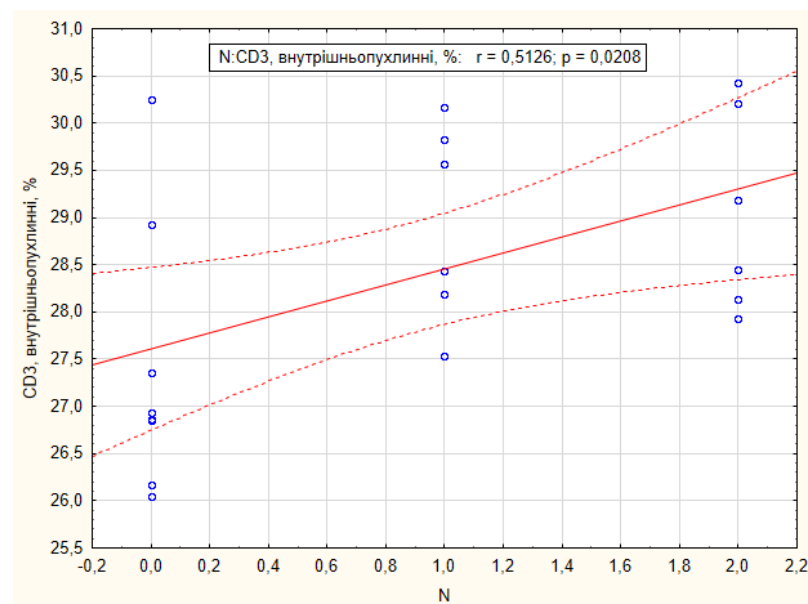


Рисунок 5. 13 Кореляційний взаємозв'язок між наявністю лімфогенних метастазів та внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів ($r=+0,51$; $p=0,02$).

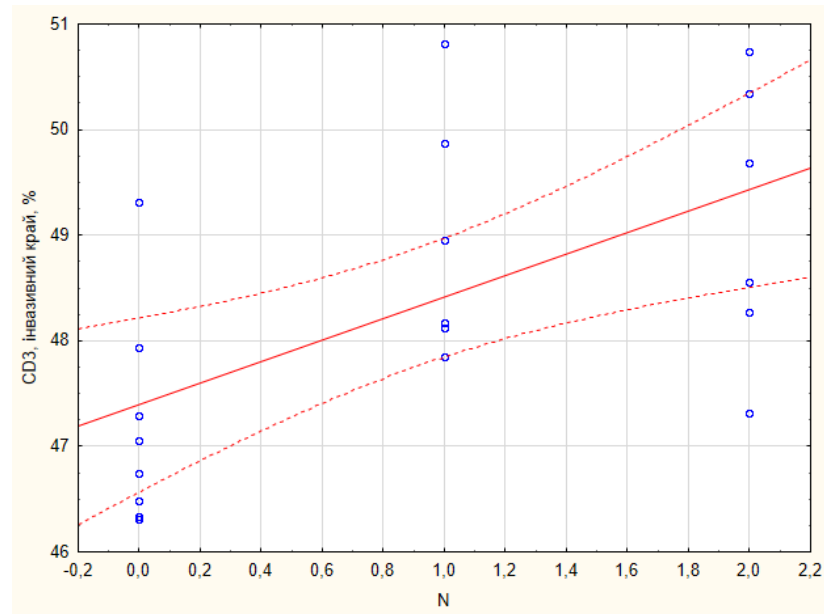


Рисунок 5. 14 Кореляційний взаємозв'язок між наявністю лімфогенних метастазів та CD3 лімфоцитів на інвазивному краї ($r=+0,65$; $p=0,002$).

Лімфоцити CD3-внутрішньопухлинні позитивно корелювали з N ($r=+0,51$; $p=0,02$), CD3 на інвазивному краї пухлини також позитивно корелювали з N ($r=+0,65$; $p=0,002$). Структури з частковою ендотеліальною вистилкою переважали в атипових дилатованих капілярах ($r=+0,72$; $p=0,0003$).

Нами визначені високі прямі кореляційні зв'язки між надекспресією COX-2 і внутрішньопухлинними CD3-лімфоцитами ($r=+0,73$; $p=0,0002$), і також COX-2 і CD3-лімфоцитами на інвазивному краї ($r=+0,75$; $p=0,0001$), прямі середньої сили кореляційні зв'язки між надекспресією COX-2 і CD20 та CD56-лімфоцитами внутрішньопухлинними ($r=+0,50$; $p=0,02$ і $r=+0,48$; $p=0,03$, відповідно), а також CD20 і CD56-лімфоцитами на інвазивному краї ($r=+0,55$; $p=0,01$ і $r=+0,68$; $p=0,0009$, відповідно).

У групі пацієнтів з Her-2/neu молекулярним підтипом протокового раку нами встановлено високий прямий кореляційний зв'язок між дилатованими капілярами і низьким рівнем експресії E-кадгерину пухлинними клітинами ($r=+0,74$; $p=0,0003$), помірний зв'язок з високою експресією COX-2 ($r=+0,43$; $p=0,05$). Окрім того, нами визначено високий прямий кореляційний зв'язок дилатованих капілярів з лімфоцитарною інфільтрацією

(внутрішньопухлинною і на інвазивному краї): CD3 ($r = +0,71$; $p = 0,0005$ і $r = +0,79$; $p = 0,00004$, відповідно), CD20 ($r = +0,78$; $p = 0,00008$ і $r = +0,76$; $p = 0,0001$, відповідно), CD56 ($r = +0,81$; $p = 0,00002$ і $r = +0,82$; $p = 0,00001$, відповідно) і порожнистими округлої та овальної форми структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r = +0,71$; $p = 0,0006$). Атипові дилатовані капіляри у внутрішньопухлинній стромі, в яких вистилка судин представлена хаотично розташованими ендотеліальними клітинами, які нашаровуються одна на одну, продемонстрували прямий помірний кореляційний зв'язок з низькою експресією пухлинними клітинами E-кадгерину ($r = +0,45$; $p = 0,01$) і прямі помірні і високі кореляційні зв'язки з лімфоцитарною інфільтрацією (внутрішньопухлинною та на інвазивному краї), аналогічно з дилатованими капілярами: з CD3 ($r = +0,68$; $p = 0,001$ і $r = +0,71$; $p = 0,0007$, відповідно), CD20 ($r = +0,68$; $p = 0,001$ і $r = +0,67$; $p = 0,001$, відповідно), CD56 ($r = +0,70$; $p = 0,0007$ і $r = +0,72$; $p = 0,0005$, відповідно), зі структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r = +0,67$; $p = 0,001$), наявністю дилатованих капілярів ($r = +0,90$; $p = 8,92952635523025E-08$) і наявністю мономорфного морфологічного типу структур пухлинних комплексів ($r = +0,54$; $p = 0,02$).

Кореляція за Спірменом продемонструвала прямий помірний і високий зв'язок між надекспресією COX-2 і CD3-лімфоцитами як внутрішньопухлинними ($r = +0,47$; $p = 0,04$), так і CD3-лімфоцитами на інвазивному краї ($r = +0,70$; $p = 0,0008$), також прямий помірний і високий зв'язок між надекспресією COX-2 і CD20 та CD56-лімфоцитами внутрішньопухлинними ($r = +0,66$; $p = 0,002$ і $r = +0,70$; $p = 0,0008$, відповідно), і помірний – між CD20 і CD56-лімфоцитами на інвазивному краї ($r = +0,61$; $p = 0,01$ і $r = +0,69$; $p = 0,001$, відповідно).

Люмінальний А підтип карцином характеризувався наявністю кореляційних зв'язків між одиничними дилатованими капілярами в пухлинній тканині та високою експресією COX-2 ($r = +0,55$; $p = 0,004$), причому надмірна експресія COX-2 визначалася в поодиноких випадках і переважала у пацієток пременопаузального віку.

Прямі позитивні кореляційні зв'язки помірного і високого рівня нами були встановлені між дилатованими капілярами і CD3 лімфоцитами внутрішньопухлинними і на інвазивному краї ($r= +0,63$; $p=0,0007$ і $r= +0,70$; $p=0,00009$, відповідно), CD20 ($r= +0,65$; $p=0,0004$ і $r= +0,65$; $p=0,0004$, відповідно), CD56 ($r= +0,64$; $p=0,0005$ і $r= +0,66$; $p=0,0003$, відповідно), зі структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r= +0,72$; $p=0,00004$), наявністю атипівих дилатованих капілярів ($r= +0,72$; $p=0,00004$) і наявністю мономорфного морфологічного типу структур пухлинних комплексів ($r= +0,43$; $p=0,03$). Але потрібно наголосити, що тільки у двох випадках інвазивний компонент пухлини характеризувався наявністю одного виду структур і це були низькодиференційовані карциноми.

Що стосується атипівих дилатованих капілярів, наявність одиничних їх у пухлині корелювала з низькою експресією COX-2 ($r= +0,41$; $p=0,04$), це були помірнодиференційовані пухлини, а множинні атипіві дилатовані капіляри характеризувалися наявністю кореляцій з низькою експресією пухлинними клітинами E-кадгерину ($r= +0,58$; $p=0,002$), надекспресією COX-2 ($r= +0,58$; $p=0,002$), з метастазами в лімфатичні вузли N2 ($r= +0,70$; $p=0,00009$) та з G3 ступенем диференціації ($r= +0,68$; $p=0,0002$) і мономорфним типом морфологічних структур пухлинних комплексів ($r= +0,68$; $p=0,0002$).

Також нами були встановлені прямі позитивні кореляційні зв'язки середньої сили між атипівими дилатованими капілярами та лімфоцитарною інфільтрацією (внутрішньопухлинною та на інвазивному краї): з CD3 лімфоцитами ($r= +0,55$; $p=0,004$ і $r= +0,69$; $p=0,0001$, відповідно), CD20 ($r= +0,62$; $p=0,001$ і $r= +0,51$; $p=0,01$, відповідно), CD56 ($r= +0,59$; $p=0,001$ і $r= +0,56$; $p=0,003$, відповідно), наявними дилатованими капілярами ($r= +0,72$; $p=0,00004$) та одиничними і множинними структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r= +0,43$; $p=0,03$ і $r= +0,69$; $p=0,0001$ відповідно).

Крім того, кореляція за Спірменом продемонструвала обернені середньої величини зв'язки між слабкою експресією COX-2 і лімфоцитарною інфільтрацією. Так, встановлено обернений помірний зв'язок між низькою

експресією COX-2 і CD3-лімфоцитами як внутрішньопухлинними ($r = -0,47$; $p = 0,02$), так і CD3-лімфоцитами на інвазивному краї ($r = -0,65$; $p = 0,0004$), також помірний зв'язок між низькою експресією COX-2 і CD20 та CD56-лімфоцитами внутрішньопухлинними ($r = -0,45$; $p = 0,03$ і $r = -0,47$; $p = 0,02$, відповідно), і CD20 і CD56-лімфоцитами на інвазивному краї ($r = -0,55$; $p = 0,004$ і $r = -0,47$; $p = 0,02$, відповідно).

В інвазивному компоненті люмінального В підтипу протокового раку нами встановлено кореляційні зв'язки між прогностичними параметрами: прямий помірний кореляційний зв'язок між дилатованими капілярами і внутрішньопухлинними лімфоцитами CD20 ($r = +0,40$; $p = 0,02$), CD20 лімфоцитами на інвазивному краї ($r = +0,38$; $p = 0,03$), внутрішньопухлинними лімфоцитами CD56 ($r = +0,41$; $p = 0,02$) і CD56 лімфоцитами на інвазивному краї ($r = +0,39$; $p = 0,03$). Проте між дилатованими капілярами і Т-лімфоцитами (CD3) нами виявлено недостовірний кореляційний зв'язок ($p > 0,05$). Крім того, дилатовані капіляри мали пряму помірну достовірну кореляцію з атиповими дилатованими капілярами ($r = +0,59$; $p = 0,004$), з поліморфізмом структур пухлинних комплексів ($r = +0,68$; $p = 0,0003$), зокрема з наявністю п'яти типів морфологічних структур ($r = +0,50$; $p = 0,05$) та одиничними структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r = +0,44$; $p = 0,03$).

Атипові дилатовані капіляри демонстрували помірний прямий достовірний кореляційний зв'язок з низьким рівнем експресії E-кадгерину пухлинними клітинами ($r = +0,47$; $p = 0,03$), високий – з одиничними структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r = +0,90$; $p = 0,00003$). З іншими прогностичними параметрами, такими як COX-2, мономорфний чи поліморфний морфологічний тип структур пухлинних комплексів, кореляційний зв'язок був недостовірний ($p > 0,05$).

Нами також був встановлений поєднаний взаємозв'язок між прогностичними параметрами різних категорій відповідно до раніше встановленого категорійного рейтингу Коледжу американських патологів [69] в молекулярних підтипах інвазивної протокової карциноми грудної залози. На

рис. 5.15 зображено поєднаний взаємозв'язок наявності атипівих дилатованих капілярів, внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів (у %) і стадії N в потрійному негативному раку, який демонструє, що частка CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів зростає при збільшенні кількості атипівих дилатованих капілярів та при наявній більшій стадії N. Також нами встановлено поєднаний взаємозв'язок наявності атипівих дилатованих капілярів, внутрішньопухлинних CD20 лімфоцитів (у %) та стадії метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N). Такий поєднаний взаємозв'язок також демонструє збільшення частки CD20 внутрішньопухлинних лімфоцитів при збільшенні кількості атипівих дилатованих капілярів та при наявній вищій стадії N (рис. 5.16).

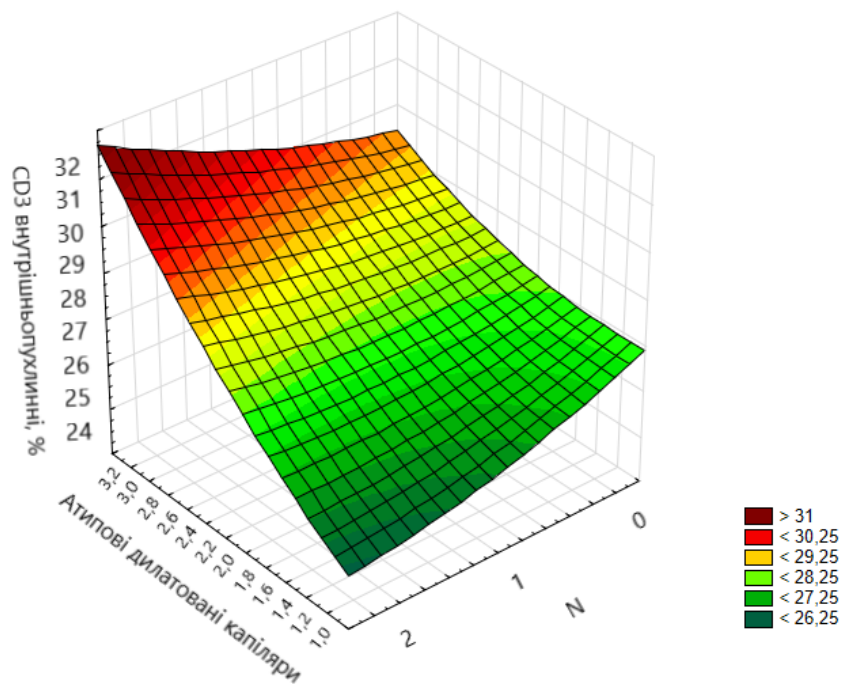


Рисунок 5.15 Поєднаний взаємозв'язок наявності атипівих дилатованих капілярів, внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів (у %) та стадії метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N) (потрійний негативний молекулярний підтип).

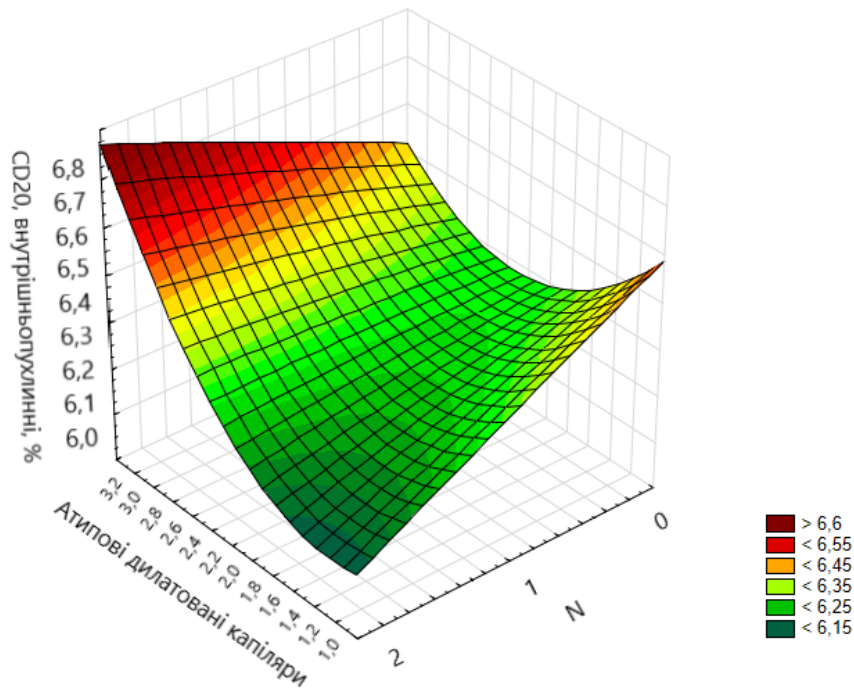


Рисунок 5.16 Поєднаний взаємозв'язок наявності атипівих дилатованих капілярів, внутрішньопухлинних CD20 лімфоцитів (у %) та стадії метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N) (потрійний негативний молекулярний підтип).

Крім того, в потрійному негативному підтипі нами встановлено поєднаний взаємозв'язок наявності атипівих дилатованих капілярів, внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів (у %) і стадії метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N). Цей поєднаний взаємозв'язок демонструє, що при метастатичному ураженні лімфатичних вузлів (N1-2) спостерігається збільшення є частки внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів на тлі збільшення кількості атипівих дилатованих капілярів і (рис. 5.17). Кореляційний зв'язок за Спірменом показав наявність прямої помірної кореляції між низькою експресією E-кадгерину і ступенем диференціації пухлини (G) в потрійному негативному підтипі ($r = +0,53$; $p = 0,02$), зокрема G3 ($r = +0,48$; $p = 0,03$), між низькою експресією E-кадгерину і внутрішньопухлинними CD3 лімфоцитами ($r = +0,61$; $p = 0,004$) і між G та внутрішньопухлинними CD3 лімфоцитами ($r = +0,48$; $p = 0,03$).

Нами також встановлено поєднаний взаємозв'язок між низькою експресією Е-кадгерину, ступенем диференціації карциноми G3 і наявністю внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів, який демонструє, що в низькодиференційованих карциномах (G3) з низькою експресією Е-кадгеринів пухлинними клітинами частка CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів зростає (рис. 5.18).

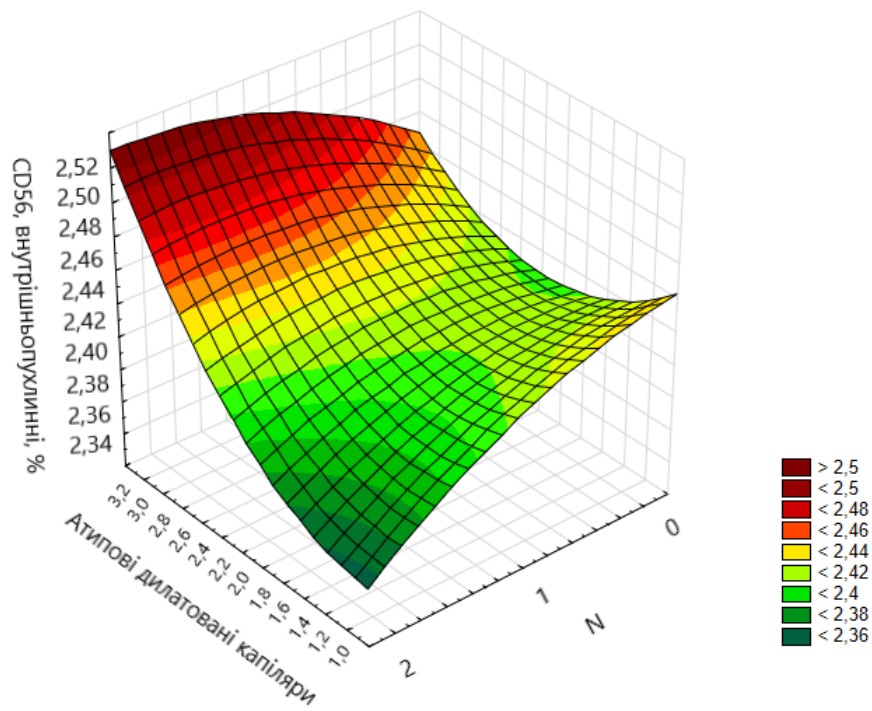


Рисунок 5.17 Поєднаний взаємозв'язок наявності атипових дилатованих капілярів, внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів (у %) та стадії метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N) (потрійний негативний молекулярний підтип).

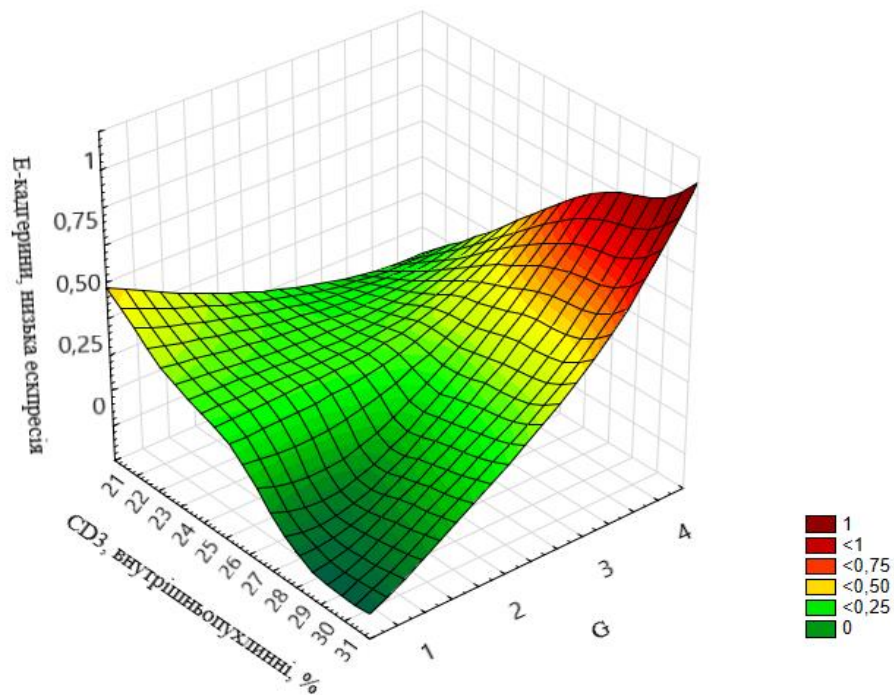


Рисунок 5.18 Поєднаний взаємозв'язок наявності низької експресії E-кадгеринів, внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів (у %) і ступеня диференціації пухлини (G) (потрійний негативний молекулярний підтип).

У групі пацієнтів з Her-2/neu молекулярним підтипом протокового раку нами встановлено прямий високий кореляційний зв'язок між низьким рівнем експресії E-кадгерину пухлинними тканинами і CD20 лімфоцитами на інвазивному краї ($r = +0,70$; $p = 0,0008$), між низьким рівнем експресії E-кадгерину пухлинними тканинами і структурами з частковою ендотеліальною вистилкою ($r = +0,86$; $p = 2,83179975081773E-06$), між структурами з частковою ендотеліальною вистилкою і CD20 лімфоцитами на інвазивному краї ($r = +0,77$; $p = 0,0001$).

Крім того, нами встановлено поєднаний взаємозв'язок між низькою експресією E-кадгерину, структурами з частковою ендотеліальною вистилкою і відсотком CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини, який демонструє, що в пухлинах з низькою експресією E-кадгеринів буде спостерігатися збільшення структур з частковою ендотеліальною вистилкою і збільшення відсотка CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини (рис. 5.19).

Люмінальний А підтип карцином характеризувався наявністю високої експресії Е-кадгерину пухлинними клітинами у 64,00 % випадків, причому висока експресія Е-кадгерину визначалася у пацієток як пременопаузального, так і постменопаузального віку, проте пацієтки у віці більше 50 років були значно асоційовані з високою експресією Е-кадгерину. В інвазивному компоненті нами встановлено зворотні помірні кореляційні зв'язки між високою експресією Е-кадгерину і лімфоцитарною інфільтрацією CD3 на інвазивному краї ($r = -0,55$; $p = 0,003$), високою експресією Е-кадгерину і наявністю мономорфних морфологічних структур в інвазивному компоненті ($r = -0,39$; $p = 0,05$), причому тільки у двох випадках інвазивний компонент характеризувався наявністю лише одного виду структур і це були низькодиференційовані карциноми. Крім того, нами встановлено прямий помірний кореляційний зв'язок між високим рівнем експресії Е-кадгерину пухлинними тканинами і змішаною будовою (два-три типи морфологічних структур) інвазивного компонента ($r = +0,38$; $p = 0,05$). У 32% випадків інфільтративний компонент мав змішану будову, складався з чотирьох морфологічних структур і в 24% - з трьох, тобто у більше половини випадків одночасно діагностували різні типи - трабекулярні, солідні, альвеолярні, тубулярні структури. Кореляційний зв'язок за Спірменом показав також наявність прямої помірної кореляції між CD3 лімфоцитами на інвазивному краї і морфологічною будовою інвазивного компонента ($r = +0,45$; $p = 0,02$).

Нами встановлено поєднаний взаємозв'язок між високою експресією Е-кадгерину, відсотком CD3 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини і морфологічною будовою інвазивного компонента, який демонструє, що в пухлинах з високою експресією Е-кадгеринів буде спостерігатися зменшення відсотка CD3 лімфоцитів на інвазивному краї і наявність морфологічної будови інвазивного компонента, переважно з двох різних типів структур (рис. 5.20).

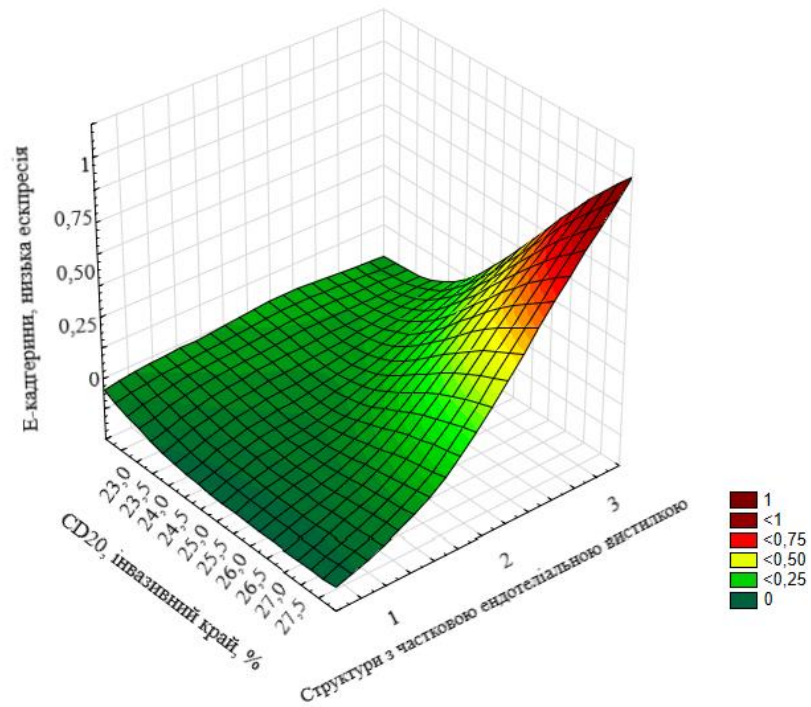


Рисунок 5.19 Поєднаний взаємозв'язок наявності низької експресії Е-кадгеринів, CD20 лімфоцитів на інвазивному краї (у %) і структур з частковою ендотеліальною вистилкою (Her-2/neu молекулярний підтип).

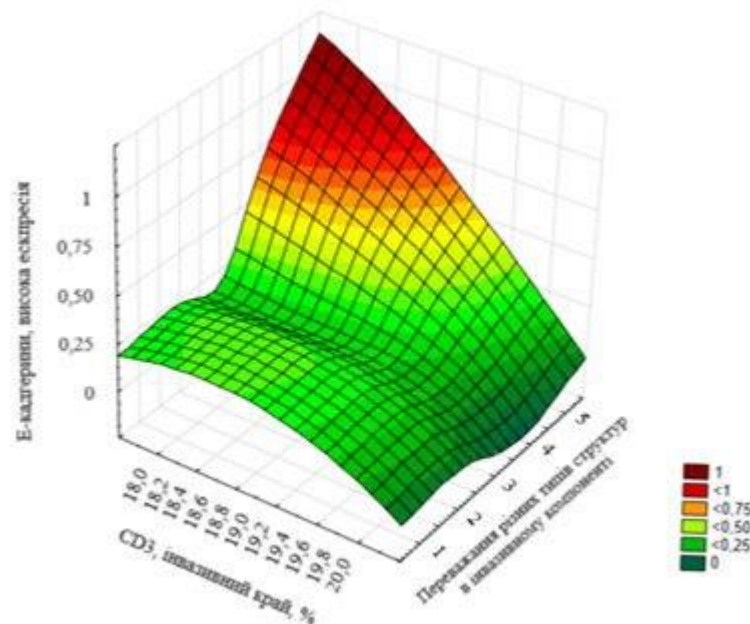


Рисунок 5.20 Поєднаний взаємозв'язок наявності високої експресії Е-кадгеринів, CD3 лімфоцитів на інвазивному краї (у %) і морфологічних структур в інвазивному компоненті (Люмінальний А молекулярний підтип).

У пацієнок з люмінальним В раком грудної залози дослідження Е-кадгерину продемонструвало низьку і негативну експресію у 12 спостереженнях (54,55 [33,95-74,36] %) і високу – в 10 випадках 45,45 [25,64-66,05] %). У вікових групах до 50 років і більше 50 незначно переважала низька і негативна експресія ($p > 0,05$). Кореляційні зв'язки між низькою експресією Е-кадгерину та прогностичними параметрами інфільтративного протокового РГЗ продемонстрували наступне: виявлено достовірний прямий високий кореляційний зв'язок з N ($r = +0,75$; $p = 0,0003$), з N2 ($r = +0,76$; $p = 0,0005$), помірної сили з надекспресією COX-2 ($r = +0,37$; $p = 0,05$), з CD20 лімфоцитами на інвазивному краї ($r = +0,37$; $p = 0,04$), з внутрішньопухлинними CD56 лімфоцитами ($r = +0,33$; $p = 0,05$). Нами також визначено поєднаний взаємозв'язок між низькою експресією Е-кадгерину, відсотком CD56 лімфоцитів внутрішньопухлинних і стадією метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N), який демонструє, що в пухлинах з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів спостерігається низька експресія Е-кадгеринів і збільшення відсотка внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів і (рис. 5.21).

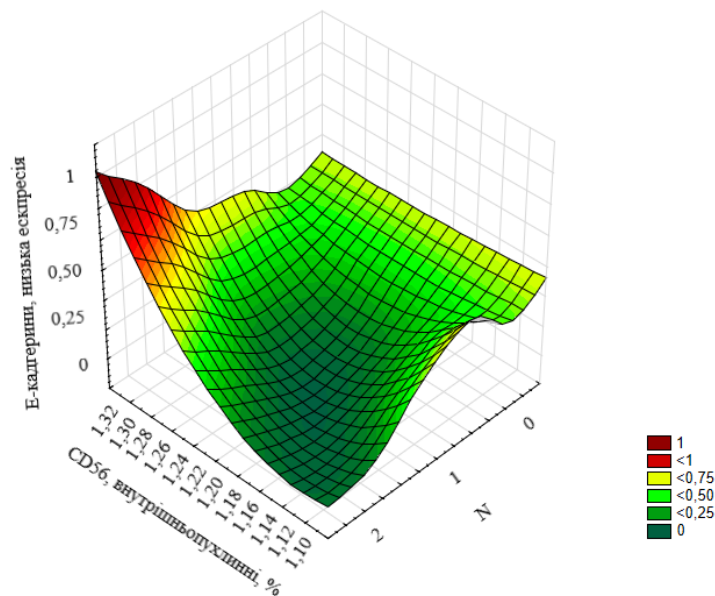


Рисунок 5.21 Поєднаний взаємозв'язок наявності низької експресії Е-кадгеринів, CD56 лімфоцитів внутрішньопухлинних (у %) і стадії метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N) (Люмінальний В молекулярний підтип).

Висновки до Розділу 5

Проведені дослідження дозволили нам проаналізувати експресію маркерів, що характеризують інвазивні властивості протокового раку грудної залози, їх зв'язок із морфологічними параметрами і основними прогностичними чинниками та молекулярним підтипом пухлини.

Було встановлено, що наявність дилатованих та атипових дилатованих капілярів, структур з частковою ендотеліальною вистилкою корелювала з такими прогностичними параметрами, як Е-кадгерин, циклооксигеназа-2 (COX-2), інфільтруючі пухлину лімфоцити, щільність та інтенсивність їх експресії, морфологічні структури в інвазивному компоненті.

У хворих з потрійним негативним підтипом встановлені поєднані взаємозв'язки наявності атипових дилатованих капілярів, внутрішньопухлинних CD3 і CD20 лімфоцитів (у %) і стадії N демонструють, що при наявній більшій стадії N (ураження лімфатичних вузлів) частка CD3 і CD20 внутрішньопухлинних лімфоцитів зростає при збільшенні кількості атипових дилатованих капілярів.

Кореляційний зв'язок за Спірменом показав наявність прямої помірної кореляції між ступенем диференціації пухлини (G) і низькою експресією Е-кадгерину, між низькою експресією Е-кадгерину і внутрішньопухлинними CD3 лімфоцитами, між G та внутрішньопухлинними CD3 лімфоцитами.

Нами також встановлено поєднаний взаємозв'язок між низькою експресією Е-кадгерину, ступенем диференціації карциноми G3 і наявністю внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів, який демонструє, що в низькодиференційованих карциномах (G3) частка CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів зростає при низькій експресії пухлинними клітинами Е-кадгеринів.

У люмінальному А підтипі встановлено поєднаний взаємозв'язок між високою експресією Е-кадгерину, відсотком CD3 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини і морфологічною будовою інвазивного компонента, який демонструє, що в пухлинах з високою експресією Е-кадгеринів буде

спостерігатися зменшення відсотка CD3 лімфоцитів на інвазивному краї і наявність морфологічної будови інвазивного компонента, переважно з двох різних типів гістологічних структур.

У пацієток з люмінальним В раком грудної залози поєднаний взаємозв'язок між низькою експресією E-кадгерину, відсотком CD56 лімфоцитів внутрішньопухлинних і стадією метастатичного ураження лімфатичних вузлів (N) демонструє, що в пухлинах з метастатичним ураженням лімфатичних вузлів спостерігається низька експресія E-кадгеринів і збільшення відсотка внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів.

У групі пацієнтів з Her-2/neu молекулярним підтипом протокового раку нами встановлено поєднаний взаємозв'язок між низькою експресією E-кадгерину, структурами з частковою ендотеліальною вистилкою і відсотком CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини, який демонструє, що в пухлинах з низькою експресією E-кадгеринів спостерігається збільшення структур з частковою ендотеліальною вистилкою і збільшення відсотка CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини.

Результати дослідження, викладені у Розділі 5, опубліковані в наступних наукових працях:

1. Volos L., Dudash A. Cox-2 overexpression in triple-negative invasive ductal breast cancer with correlation to clinicopathological parameters and neoangiogenesis (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). The Breast (Journal Indexing – Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S35-36. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledge.com>
2. Volos L., Dudash A. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer and relationship with clinicopathological factors (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). The Breast (Journal Indexing – Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S36-37. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledge.com>

РОЗДІЛ 6

МОДЕЛЮВАННЯ ПРОГНОСТИЧНИХ РІВНІВ ПУХЛИНО-ІНФІЛЬТРУЮЧИХ ЛІМФОЦИТІВ ПРИ РІЗНИХ МОЛЕКУЛЯРНИХ ПІДТИПАХ ІНФІЛЬТРАТИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ

З метою правильної оцінки значної кількості взаємодіючих чинників на результати дослідження, безпомилкового виділення незалежних предикторів та інтерпретації отриманих результатів, нами використані методи мультифакторного статистичного аналізу. Мультифакторний регресійний аналіз проводився методом лінійної регресії за допомогою програми SPSS. Включення показників у модель прогнозування відбувалось методом покрокового відбору, що дозволило відібрати значимі найоптимальніші моделі для кожної групи пацієнтів.

У нашій роботі регресійна мультифакторна модель дозволяє спрогнозувати значення показників CD3, CD20, CD56 для пацієнтів кожної групи залежно від поданих чинників.

Потрійно негативний підтип інфільтративного протокового раку грудної залози: прогнозування значення показників внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів (%)

Проведений мультифакторний регресійний аналіз між незалежними (клініко-патогістологічними факторними ознаками, $n=39$) та залежними (показником CD3 внутрішньопухлинним (в/п)) предикторами у 20 пацієнтів, хворих на РГЗ з потрійним негативним молекулярним підтипом (група 1), показав доведений сильний вплив трьох факторів: прямий вплив наявності атипівих дилатованих капілярів ($p<0,001$) та одного типу (Тип 1) морфологічних структур в інвазивному компоненті ($p=0,005$), зворотній вплив пухлини за розміром T1 ($p=0,001$). Коефіцієнт множинної кореляції становив $R=+0,92$, при $p=0,0046$ (за Фішером $F=10,85$) та стандартній похибці оцінки

(SEE – standard error of estimate) 0,61. У 81,44% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD3 в/п (скоригований коефіцієнт множинної детермінації $R^2_{adj}=+0,81$).

Обраховані β -коефіцієнти цих факторів для формування моделі прогнозування значення показника CD3 в/п у жінок групи 1 наведено в таблиці 6.1.

Таблиця 6.1

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD3 (внутрішньопухлинних) (потрійний негативний молекулярний підтип)

Показники	Умовне позначення	β - коефіцієнти	SEE	p
Константа		26,0923	0,47	<0,001
Атипові дилатовані капіляри (1-немає, 2-одинокі, 3-множинні)	X1	1,0630	0,20	<0,001
Стадія T1 (1 – є, 0 – немає)	X2	-1,3427	0,31	0,001
Тип1 морфологічної будови (1 – є, 0 – немає)	X3	1,0305	0,31	0,005

Для підтвердження правильності побудованої моделі обраховували критерій автокореляції Дурбіна-Уотсона, який становив 1,97, що не виходить за межі норми 1,5-2,5, і підтверджує достовірність сформованої моделі.

Лінійне рівняння моделі логістичної регресії щодо прогнозованого значення CD3 в/п буде мати такий вигляд:

$$CD3 \text{ в/п} = 1,0630 \times X1 - 1,3427 \times X2 + 1,0305 \times X3 + 26,0923$$

За підрахунками середнє прогнозоване значення показника CD3 в/п складає $28,37 \pm 1,30$ (мінімальне значення 25,81, максимальне 30,31), що

співпадає з фактичним середнім значенням $28,37 \pm 1,41$ у групі 1 (потрійного негативного підтипу РГЗ).

Для оцінки ефективності створеної моделі було проведено ROC-аналіз із побудовою кривої (рис. 6.1).

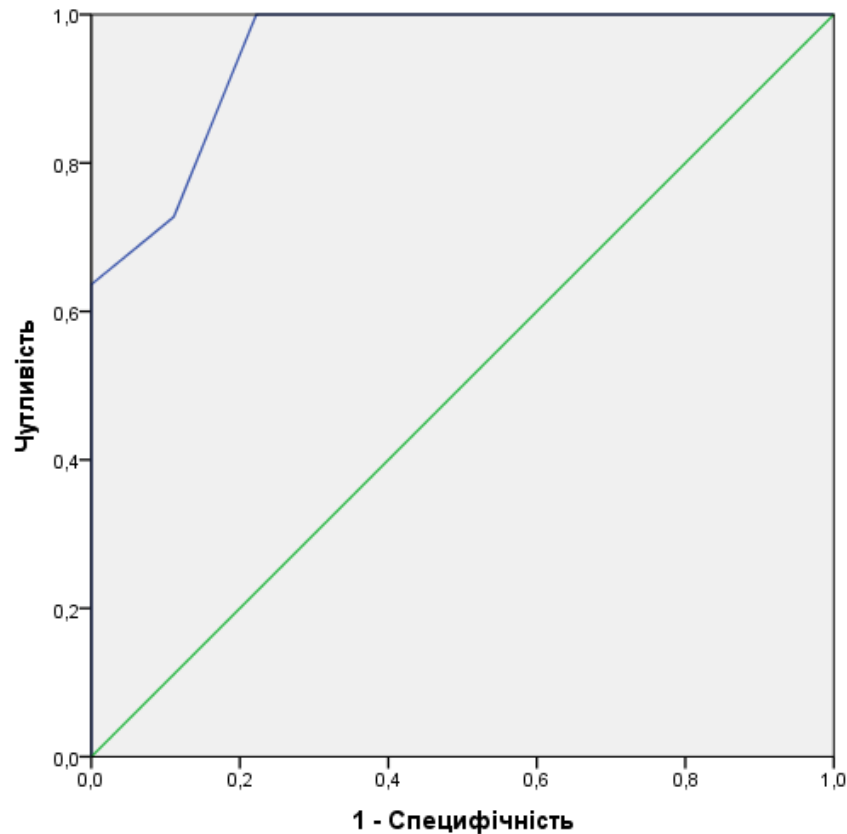


Рисунок 6.1 – ROC-крива діагностичного тестування якості мультифакторної регресивної моделі показника CD3 в/п у пацієнтів з РГЗ групи 1

Обчислена площа під ROC-кривою склала 94,95% ($AUC = 0,95$ [0,86-1,00] при $p=0,001$ та $SEE=0,05$), що відповідає «відмінній» якості створеної моделі згідно з експертною шкалою AUC.

Діагностична ефективність моделі підтверджена високими пороговими показниками чутливості (100,00%) та специфічності (77,78%).

Для перевірки роботи цієї моделі нами було відібрано пацієнтки з різними показниками внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів.

Приклад №1. Пацієнтка № 6 у базі даних групи 1: жінка, 31 рік, розмір пухлини T2 (у формулу поставимо 0), одиничні атипові дилатовані капіляри

(у формулу включимо 2), переважання 2-х різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (у формулі буде відповідно 0). Значення $CD3 \text{ в/п} = 28,43$.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$CD3 \text{ в/п} = 1,0630 \times 2 - 1,3427 \times 0 + 1,0305 \times 0 + 26,0923 = 28,22$$

Таким чином, прогнозоване значення 28,22 практично збігається із фактичним значенням показника $CD3 \text{ в/п}$ цієї хворої (різниця між значеннями цих показників <5%).

Приклад №2. Пацієнтка № 18 у базі даних групи 1: жінка, 65 років, розмір пухлини T2 (у формулу поставимо 0), множинні атипові дилатовані капіляри (у формулу включимо 3), переважання одного типу морфологічних структур в інвазивному компоненті (у формулі буде відповідно 1). Значення $CD3 \text{ в/п} = 30,43$.

Внесення відповідних показників пацієнтки у формулу моделі дає наступне рівняння:

$$CD3 \text{ в/п} = 1,0630 \times 3 - 1,3427 \times 0 + 1,0305 \times 1 + 26,0923 = 30,31$$

Таким чином, отримане прогнозоване значення 30,31 є близьке до фактичного значення показника $CD3 \text{ в/п}$ даної пацієнтки (різниця в 0,12 між значеннями цих показників є менше 5%).

Потрійний негативний підтип інфільтративного протокового раку грудної залози: прогнозування значення показників $CD3$ лімфоцитів на інвазивному краї (%)

Проведений нами мультифакторний регресійний аналіз між незалежними (клініко-патогістологічними факторними ознаками, $n=39$) та

залежними (показником CD3 на інвазивному краї) предикторами у 20 пацієнтів, хворих на РГЗ з потрійним негативним молекулярним підтипом (група 1), продемонстрував доведений сильний вплив наступних трьох факторів: прямий вплив наявності пухлини за розміром T2 ($p=0,013$) і ступеня диференціації пухлини (G, $p=0,0003$), зворотній вплив слабкої експресії COX-2 ($p<0,00001$). Коефіцієнт множинної кореляції становив $R=+0,9$, при $p=0,013$ (за Фішером $F=7,73$) та стандартній похибці оцінки (SEE – standard error of estimate) 0,68. У 77,6% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD3 на інвазивному краї (скоригований коефіцієнт множинної детермінації $R^2_{adj}=+0,78$).

Обраховані β -коефіцієнти цих факторів для формування моделі прогнозування значення показника CD3 на інвазивному краї пухлини у пацієток групи 1 наведено в таблиці 6.2.

Для підтвердження правильності побудованої моделі обраховували критерій автокореляції Дурбіна-Уотсона, який становив 1,78, що не виходить за межі норми 1,5-2,5, і підтверджує достовірність сформованої моделі.

Лінійне рівняння моделі логістичної регресії щодо прогнозованого значення CD3 на інвазивному краї буде мати наступний вигляд:

$$\text{CD3 на інвазивному краї} = 45,47 - 2,1 \times X_1 + 1,20 \times X_2 + 0,86 \times X_3$$

За підрахунками середнє прогнозоване значення показника CD3 на інвазивному краї складає $48,31 \pm 1,30$ (мінімальне значення 45,76, максимальне 50,26), що співпадає з фактичним середнім значенням $48,31 \pm 1,45$ у групі 1 (потрійного негативного підтипу РГЗ).

Для оцінки ефективності створеної моделі було проведено ROC-аналіз із побудовою кривої (рис. 6.2).

Таблиця 6.2

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD3 на інвазивному краї пухлини (потрійний негативний молекулярний підтип)

Показники	Умовне позначення	β - коефіцієнти	SEE	t	p
Константа		45,47	0,70	64,80	0,0000
COX-2 слабка (0 – є, 1 – немає)	X1	-2,10	0,36	-5,89	0,0000
G (G1 – 1, G2 – 2, G3 – 3, G4 – 4)	X2	1,20	0,26	4,58	0,0003
T2 (1 – є, 0 – немає)	X3	0,86	0,31	2,78	0,013

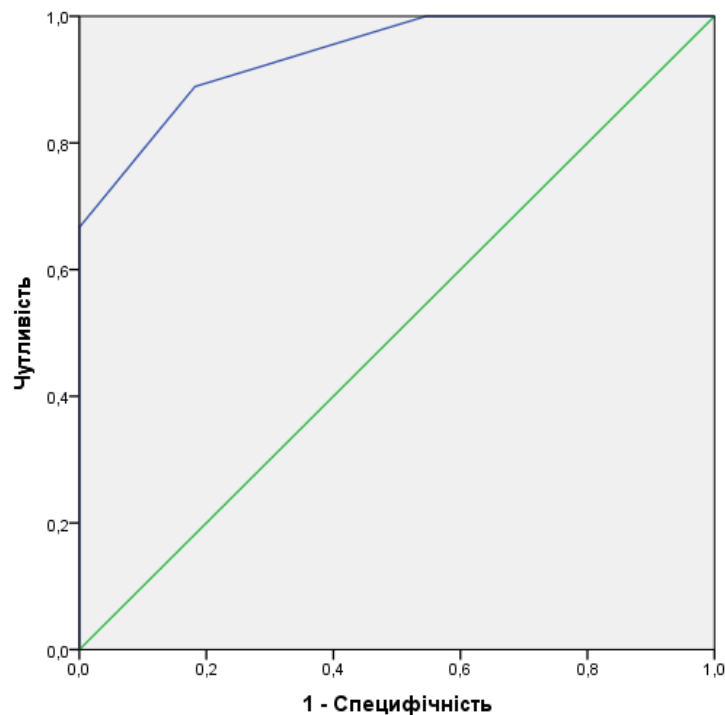


Рисунок 6.2 – ROC-крива діагностичного тестування якості мультифакторної регресивної моделі показника CD3 на інвазивному краї у пацієнтів з РГЗ з потрійним негативним молекулярним підтипом групи 1

Обчислена площа під ROC-кривою склала 93,94% (AUC = 0,95 [0,84-1,00] при $p=0,001$ та $SEE=0,05$), що відповідає «відмінній» якості створеної моделі згідно з експертною шкалою AUC.

Діагностична ефективність моделі підтверджена високими пороговими показниками чутливості (100,00%) та специфічності (88,89%).

Для перевірки роботи цієї моделі нами було відібрано пацієнтки з різними показниками CD3 лімфоцитів на інвазивному краї.

Приклад №1. Пацієнтка № 5 у базі даних групи 1: жінка, 46 років, розмір пухлини T2 (у формулу поставимо 1), ступінь диференціювання пухлини G2 (у формулу поставимо 2), слабка експресія COX-2 (у формулу включимо 0), Значення CD3 на інвазивному краї = 48,31.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD3 на інвазивному краї} = 45,47 - 2,1 \times 0 + 1,20 \times 2 + 0,86 \times 1 = 48,73$$

Таким чином, прогнозоване значення 48,73 практично збігається із фактичним значенням показника CD3 на інвазивному краї у даної пацієнтки (різниця між значеннями цих показників <5%).

Приклад №2. Пацієнтка № 17 у базі даних групи 1: жінка, 70 років, розмір пухлини T2 (у формулу поставимо 1), ступінь диференціювання пухлини G3 (у формулу подаємо 3), слабка експресія COX-2 (у формулу включимо 0), Значення CD3 на інвазивному краї = 49,87.

Внесення відповідних показників пацієнтки у формулу моделі дає наступне рівняння:

$$\text{CD3 на інвазивному краї} = 45,47 - 2,1 \times 0 + 1,20 \times 3 + 0,86 \times 1 = 49,93$$

Отже, отримане прогнозоване значення 49,93 є близьке до фактичного значення показника CD3 на інвазивному краї у даної пацієнтки (різниця в 0,06 між значеннями цих показників є менше 5%).

Приклад №3. Пацієнтка № 20 у базі даних групи 1: жінка, 53 років, розмір пухлини T3 (у формулу поставимо 0), ступінь диференціювання

пухлини G3 (у формулу подаємо 3), надекспресія COX-2 (у формулу включимо 1), Значення CD3 на інвазивному краї = 50,34.

Внесення відповідних показників пацієнтки у формулу моделі дає наступне рівняння:

$$\text{CD3 на інвазивному краї} = 45,47 + 2,1 \times 1 + 1,20 \times 3 + 0,86 \times 0 = 51,17$$

Таким чином, отримане прогнозоване значення 51,17 є близьке до фактичного значення показника CD3 на інвазивному краї даної пацієнтки (різниця в 0,83 між значеннями цих показників є менше 5%) [274].

Her-2/neu-позитивний підтип інфільтративного протокового раку грудної залози: прогнозування значення показників CD20 лімфоцитів на інвазивному краї (%)

Мультифакторний регресійний аналіз між незалежними (клініко-патогістологічними факторними ознаками, n=39) та залежними (показником CD20 на інвазивному краї) предикторами у 19 пацієнтів, хворих на РГЗ з Her-2/neu-позитивним молекулярним підтипом (група 2), продемонстрував сильний вплив трьох факторів: прямий вплив наявності в пухлині структур з частковою ендотеліальною вистилкою (p=0,015) і метастатичне ураження лімфатичних вузлів N2 (p=0,0000), зворотній вплив ступеня диференціації пухлини G2 (p=0,004). Коефіцієнт множинної кореляції становив R=+0,99, при p=0,030 (за Фішером F=6,04) та стандартній похибці оцінки (SEE – standard error of estimate) 0,17. У 96,2% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD20 на інвазивному краї (скоригований коефіцієнт множинної детермінації R²_{adj}=+0,96).

Обраховані β-коефіцієнти цих факторів для формування моделі прогнозування значення показника CD20 на інвазивному краї пухлини у пацієнток групи 2 наведено в таблиці 6.3.

Для підтвердження правильності побудованої моделі обраховували критерій автокореляції Дурбіна-Уотсона, який становив 2,04, що не виходить

за межі норми 1,5-2,5, і підтверджує достовірність сформованої моделі.

Лінійне рівняння моделі логістичної регресії щодо прогнозованого значення CD20 на інвазивному краї буде мати наступний вигляд:

$$\text{CD20 на інвазивному краї} = 26,14 + 0,2789 \times X1 + 0,9022 \times X2 - 0,3082 \times X3$$

За підрахунками середнє прогнозоване значення показника CD20 на інвазивному краї складає $25,83 \pm 0,84$ (мінімальне значення 24,60, максимальне 27,14), що співпадає з фактичним середнім значенням $25,83 \pm 0,85$ у групі 2 (Her-2/неу-позитивний молекулярний підтип). Для оцінки ефективності створеної моделі було проведено ROC-аналіз із побудовою кривої (рис. 6.3).

Обчислена площа під ROC-кривою склала 81,25 % (AUC = 0,95 [0,59-1,00] при $p=0,023$ та $SEE=0,11$), що відповідає «відмінній» якості створеної моделі згідно з експертною шкалою AUC.

Діагностична ефективність моделі підтверджена високими пороговими показниками чутливості (100,00%) та специфічності (37,50%).

Для перевірки роботи цієї моделі представляємо випадок.

Приклад №1. Пацієнтка № 5 у базі даних групи 2: жінка, 43 років, ступінь диференціювання пухлини G2 (у формулу поставимо 0), наявність віддалених метастазів у лімфатичні вузли (у формулу поставимо 0), наявність структур з частковою ендотеліальною вистилкою (у формулу включаємо 3). Значення CD20 на інвазивному краї = 26,95.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD20 на інвазивному краї} = 26,14 + 0,2789 \times 3 + 0,9022 \times 0 - 0,3082 \times 0 = 26,97$$

Отже, отримане прогнозоване значення 26,97 є близьке до фактичного значення показника CD20 на інвазивному краї даної пацієнтки (різниця в 0,02 між значеннями цих показників є менше 5%).

Таблиця 6.3

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD20 на інвазивному краї пухлини (Her-2/neu-позитивний молекулярний підтип)

Показники	Умовне позначення	β - коефіцієнти	SEE	t	p
Константа		26,14	0,39	66,91	0,0000
Структури з частковою ендотеліальною вистилкою (1-немає, 2-одичні, 3-множинні)	X1	0,2789	0,10	2,82	0,015
N2 (0 – є, 1 – немає)	X2	0,9022	0,10	8,95	0,0000
G2 (0 – є, 1 – немає)	X3	-0,3082	0,09	-3,62	0,004

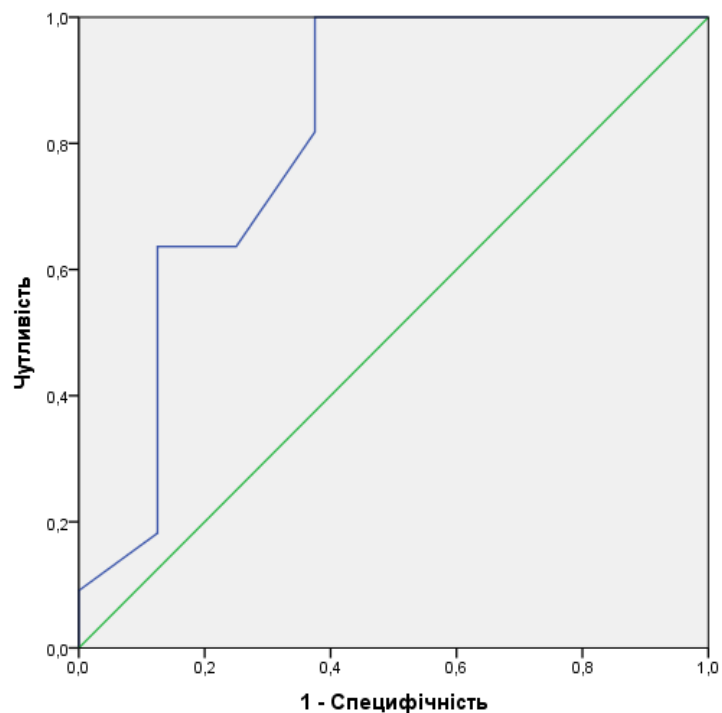


Рисунок 6.3 – ROC-крива діагностичного тестування якості мультифакторної регресивної моделі показника CD20 на інвазивному краї у пацієнтів з Her-2/neu-позитивним молекулярним підтипом РГЗ

Her-2/neu-позитивний підтип інфільтративного протокового раку грудної залози: прогнозування значення показників внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів (%)

Мультифакторний регресійний аналіз нами проведений між незалежними (клініко-патогістологічними факторними ознаками, n=39) та залежними (показником внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів) предикторами у 19 пацієнтів, хворих на РГЗ з Her-2/neu-позитивним молекулярним підтипом (група 2), показав доведений сильний вплив трьох факторів: прямий вплив наявності в пухлині дилатованих капілярів (p=0,0001), метастатичне ураження лімфатичних вузлів N (p=0,001) і розмір пухлини T (p=0,0000). Коефіцієнт множинної кореляції становив R=+0,99, при p=0,027 (за Фішером F=6,35) та стандартній похибці оцінки (SEE – standard error of estimate) 0,01. У 98,3% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів (скоригований коефіцієнт множинної детермінації R²_{adj}=+0,98).

Обраховані β-коефіцієнти цих факторів для формування моделі прогнозування значення показника внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів у пацієнток групи 2 наведено в таблиці 6.4.

Для підтвердження правильності побудованої моделі обраховували критерій автокореляції Дурбіна-Уотсона, який становив 1,92, що не виходить за межі норми 1,5-2,5, і підтверджує достовірність сформованої моделі.

Лінійне рівняння моделі логістичної регресії щодо прогнозованого значення CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів буде мати наступний вигляд:

$$\text{CD56 в/п лімфоцити} = 2,1544 + 0,0155 \times X_1 + 0,0162 \times X_2 + 0,0200 \times X_3$$

За підрахунками середнє прогнозоване значення показника CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів складає 2,26±0,04 (мінімальне значення 2,19, максимальне 2,31), що співпадає з фактичним середнім значенням 2,26±0,04 у групі 2 (Her-2/neu-позитивний молекулярний підтип). Для оцінки

ефективності створеної моделі було проведено ROC-аналіз із побудовою кривої (рис. 6.4).

Таблиця 6.4

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів (Her-2/neu-позитивний молекулярний підтип)

Показники	Умовне позначення	β - коефіцієнти	SEE	t	p
Константа		2,1544	0,01	173,54	0,0000
Дилатовані капіляри (1- немає, 2-одичні, 3-множинні)	X1	0,0155	0,00	5,82	0,0001
N (N0 – 0, N1 – 1, N2 – 2)	X2	0,0162	0,00	4,42	0,001
T (T1 – 1, T2 – 2, T3 – 3)	X3	0,0200	0,00	6,29	0,0000

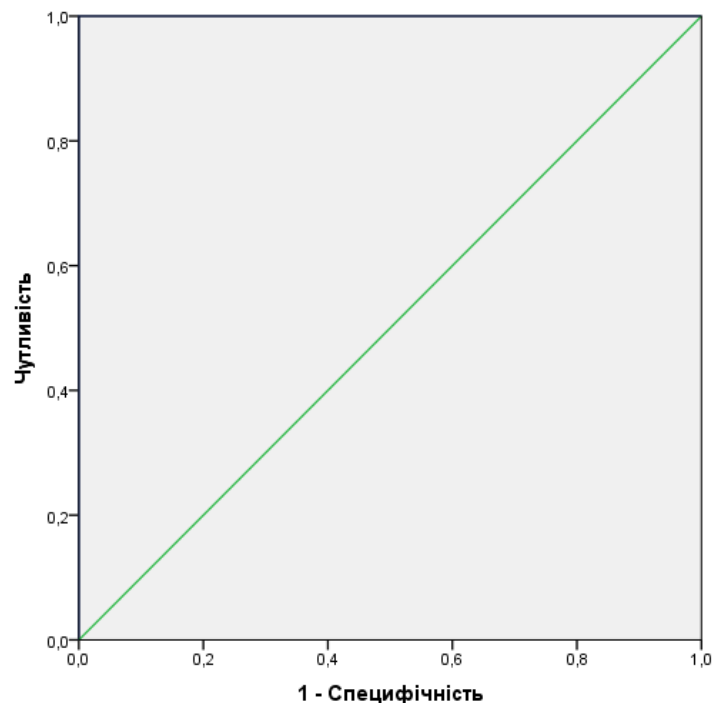


Рисунок 6.4 ROC-крива діагностичного тестування якості мультифакторної регресивної моделі показника CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів у пацієнтів з Her-2/neu-позитивним молекулярним підтипом РГЗ

Обчислена площа під ROC-кривою склала 100% (AUC = 0,95 [1,00-1,00] при $p=0,001$ та $SEE=0,00$), що відповідає «відмінній» якості створеної моделі згідно з експертною шкалою AUC.

Діагностична ефективність моделі підтверджена високими пороговими показниками чутливості (100,00%) та специфічності (100%).

Для перевірки роботи цієї моделі нами було відібрано пацієнтки з різними показниками внутрішньопухлинних CD56 лімфоцитів.

Приклад №1. Пацієнтка № 1 у базі даних групи 2: жінка, 40 років, розмір пухлини T1 (у формулу поставимо 1), наявність метастазів у лімфатичні вузли N0 (у формулу поставимо 0), наявність дилатованих капілярів (у формулу включаємо 1). Значення CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів = 2,2.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD56 в/п лімфоцити} = 2,1544 + 0,0155 \times 2 + 0,0162 \times 0 + 0,0200 \times 1 = 2,2$$

Отже, отримане прогнозоване значення 2,2 є ідентичним до фактичного значення показника CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів даної пацієнтки.

Приклад №2. Пацієнтка № 17 у базі даних групи 2: жінка, 57 років, розмір пухлини T3 (у формулу поставимо 3), наявність метастазів у лімфатичні вузли N2 (у формулу поставимо 2), наявність дилатованих капілярів (у формулу включаємо 3). Значення CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів = 2,31.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD56 в/п лімфоцити} = 2,1544 + 0,0155 \times 3 + 0,0162 \times 2 + 0,0200 \times 3 = 2,29$$

Отже, отримане прогнозоване значення 2,29 є близьке до фактичного значення показника CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів даної пацієнтки (різниця в 0,02 між значеннями цих показників є менше 5%).

Люмінальний А підтип інфільтративного протокового раку грудної залози: прогнозування значення показників CD3 лімфоцитів (%) на інвазивному краї

Проведений нами мультифакторний регресійний аналіз між незалежними (клініко-патогістологічними факторними ознаками, n=39) та залежними (показником CD3 лімфоцитів на інвазивному краї) предикторами у 25 пацієнтів, хворих на РГЗ з люмінальним А молекулярним підтипом (група 3), продемонстрував доведений сильний вплив чотирьох факторів: ступінь диференціації пухлини G (p=0,0000), метастатичне ураження лімфатичних вузлів N2 (p=0,001), розмір пухлини T (p=0,0000) і локалізація пухлини. Коефіцієнт множинної кореляції становив R=+0,96, при p=0,045 (за Фішером F=4,60) та стандартній похибці оцінки (SEE – standard error of estimate) 0,11. У 89,4% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD3 на інвазивному краї (скоригований коефіцієнт множинної детермінації $R^2_{adj}=+0,89$).

Обраховані β -коефіцієнти цих факторів для формування моделі прогнозування значення показника CD3 лімфоцитів на інвазивному краї у пацієнток групи 3 наведено в таблиці 6.5.

Для підтвердження правильності побудованої моделі обраховували критерій автокореляції Дурбіна-Уотсона, який становив 2,106, що не виходить за межі норми 1,5-2,5, і підтверджує достовірність сформованої моделі.

Лінійне рівняння моделі логістичної регресії щодо прогнозованого значення CD3 лімфоцитів на інвазивному краї буде мати наступний вигляд:

$$\text{CD3 на інвазивному краї} = 17,49 + 0,48 \times X_1 + 0,25 \times X_2 + 0,21 \times X_3 + 0,15 \times X_4$$

За підрахунками середнє прогнозоване значення показника CD3 лімфоцитів на інвазивному краї складає $18,88 \pm 0,32$ (мінімальне значення 18,11, максимальне 19,42), що співпадає з фактичним середнім значенням $18,88 \pm 0,34$ у групі 3 (Люмінальний А молекулярний підтип). Для оцінки ефективності створеної моделі було проведено ROC-аналіз із побудовою кривої (рис. 6.5).

Таблиця 6.5

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD3 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини (Люмінальний А молекулярний підтип)

Показники	Умовне позначення	β - коефіцієнти	SEE	t	p
Константа		17,49	0,13	137,98	0,0000
G (G1 – 1, G2 – 2, G3 – 3)	X1	0,48	0,05	9,80	0,0000
T (T1 – 1, T2 – 2, T3 – 3)	X2	0,25	0,04	5,79	0,0000
N2 (1 – є, 0 – немає)	X3	0,21	0,07	2,85	0,010
Зліва пухлина (1 – є, 0 – немає)	X4	0,15	0,05	2,88	0,010

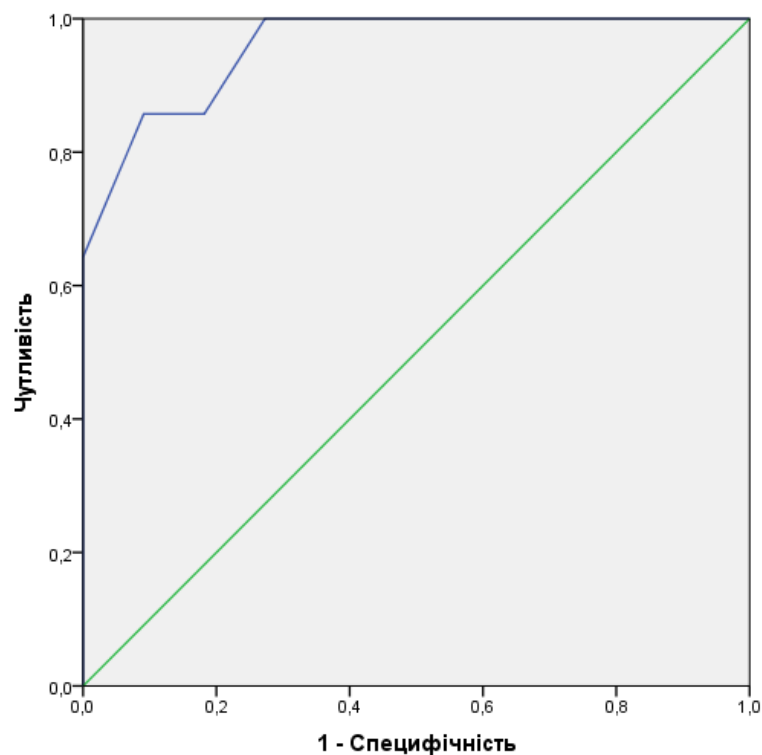


Рисунок 6.5 – ROC-крива діагностичного тестування якості мультифакторної регресивної моделі показника CD3 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини у пацієнтів з Люмінальним А молекулярним підтипом РГЗ

Обчислена площа під ROC-кривою склала 95,8% (AUC = 0,95 [0,89-1,00] при $p=0,0001$ та $SEE=0,04$), що відповідає «відмінній» якості створеної моделі згідно з експертною шкалою AUC.

Діагностична ефективність моделі підтверджена високим пороговим показником чутливості (85,71%). Для перевірки роботи цієї моделі нами було відібрано пацієнтки з різними показниками CD3 лімфоцитів на інвазивному краї.

Приклад №1. Пацієнтка № 3 у базі даних групи 3: жінка, 46 років, розмір пухлини T1 (у формулу поставимо 1), наявність метастазів у лімфатичні вузли N1 (у формулу поставимо 0), ступінь диференціації пухлини G2 (у формулу включаємо 2), локалізація пухлини у лівій грудній залозі (у формулу включаємо 1). Значення CD3 лімфоцитів на інвазивному краї = 18,75.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD3 лімфоцити на інвазивному краї} = 17,49 + 0,48 \times 2 + 0,25 \times 1 + 0,21 \times 0 + 0,15 \times 1 = 18,85$$

Таким чином, отримане прогнозоване значення 18,85 є близьке до фактичного значення показника CD3 лімфоцитів на інвазивному краї даної пацієнтки (різниця в 0,1 між значеннями цих показників є менше 5%).

Приклад №2. Пацієнтка № 4 у базі даних групи 3: жінка, 44 років, розмір пухлини T2 (у формулу поставимо 2), наявність метастазів у лімфатичні вузли N2 (у формулу поставимо 1), ступінь диференціації пухлини G2 (у формулу включаємо 2), локалізація пухлини у лівій грудній залозі (у формулу включаємо 1). Значення CD3 лімфоцитів на інвазивному краї = 19,29.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD3 лімфоцити на інвазивному краї} = 17,49 + 0,48 \times 2 + 0,25 \times 2 + 0,21 \times 1 + 0,15 \times 1 = 19,31$$

Отримане прогнозоване значення 19,31 є близьке до фактичного значення показника CD3 лімфоцитів на інвазивному краї даної пацієнтки (різниця в 0,02 між значеннями цих показників є менше 5%).

Приклад №3. Пацієнтка № 21 у базі даних групи 3: жінка, 63 років, розмір пухлини T1 (у формулу поставимо 1), відсутність метастазів у лімфатичні вузли N0 (у формулу поставимо 0), ступінь диференціації пухлини G1 (у формулу включаємо 1), локалізація пухлини в лівій грудній залозі (у формулу включаємо 1). Значення CD3 лімфоцитів на інвазивному краї = 18,73.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD3 лімфоцити на інвазивному краї} = 17,49 + 0,48 \times 1 + 0,25 \times 1 + 0,21 \times 0 + 0,15 \times 1 = 18,37$$

Отже, отримане прогнозоване значення 18,37 є близьке до фактичного значення показника CD3 лімфоцитів на інвазивному краї даної пацієнтки (різниця між значеннями цих показників є менше 5%).

Люмінальний А підтип інфільтративного протокового раку грудної залози: прогнозування значення показників CD20 лімфоцитів (%) на інвазивному краї

Мультифакторний регресійний аналіз між незалежними (клініко-патогістологічними факторними ознаками, n=39) та залежними (показником CD20 на інвазивному краї) предикторами у 25 пацієнтів з люмінальним А молекулярним підтипом РГЗ (група 3), показав доведений сильний вплив чотирьох факторів: розмір пухлини на стадії T1 (p=0,0000), метастатичне ураження лімфатичних вузлів (N, p= 0,0000), переважання різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (p=0,0000) і наявність структур з частковою ендотеліальною вистилкою (p=0,037). Коефіцієнт множинної кореляції становив R=+0,98, при p=0,037 (за Фішером F=5,02) та стандартній похибці оцінки (SEE – standard error of estimate) 0,02. У 95,4% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника

CD20 на інвазивному краї (скоригований коефіцієнт множинної детермінації $R^2_{adj}=+0,95$).

Обраховані β -коефіцієнти цих факторів для формування моделі прогнозування значення показника CD20 лімфоцитів на інвазивному краї у пацієнток групи 3 наведено в таблиці 6.6.

Для підтвердження правильності побудованої моделі обраховували критерій автокореляції Дурбіна-Уотсона, який становив 2,23, що не виходить за межі норми 1,5-2,5, і підтверджує достовірність сформованої моделі.

Лінійне рівняння моделі логістичної регресії щодо прогнозованого значення CD20 лімфоцитів на інвазивному краї буде мати наступний вигляд:

$$\text{CD20 на інвазивному краї} = 6,8260 - 0,1681 \times X_1 + 0,0998 \times X_2 - 0,0412 \times X_3 - 0,0178 \times X_4$$

За підрахунками середнє прогнозоване значення показника CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини складає $6,70 \pm 0,09$ (мінімальне значення 6,52, максимальне 6,85), що співпадає з фактичним середнім значенням $6,70 \pm 0,02$ у групі 3 (Люмінальний А молекулярний підтип).

Для оцінки ефективності створеної моделі було проведено ROC-аналіз із побудовою кривої (рис. 6.6).

Обчислена площа під ROC-кривою склала 99,3% ($AUC = 0,99 [0,97-1,00]$ при $p=0,0001$ та $SEE=0,01$), що відповідає «відмінній» якості створеної моделі згідно з експертною шкалою AUC.

Діагностична ефективність моделі підтверджена високими пороговими показниками чутливості (94,12%) та специфічності (100%).

Таблиця 6.6

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини (Люмінальний А молекулярний підтип)

Показники	Умовне позначення	β -коєфіцієнти	SEE	t	p
Константа		6,8260	0,02	307,76	0,0000
T1 (1 – є, 0 – немає)	X1	-0,1681	0,01	-16,44	0,0000
N (N0 – 0, N1 – 1, N2 – 2)	X2	0,0998	0,01	12,05	0,0000
Переважання різних типів структур (1 – є, 0 – немає)	X3	-0,0412	0,00	-8,48	0,0000
Структури з частковою ендотеліальною вистилкою (1-немає, 2-одиничні, 3-множинні)	X4	-0,0178	0,01	-2,24	0,037

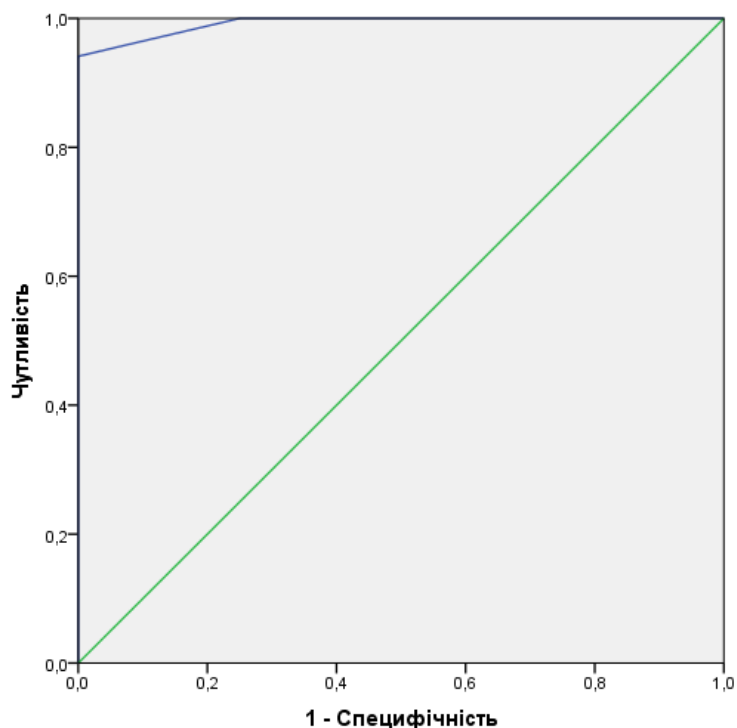


Рисунок 6.6 ROC-крива діагностичного тестування якості мультифакторної регресивної моделі показника CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини у пацієнтів з Люмінальним А молекулярним підтипом РГЗ

Для перевірки роботи цієї моделі нами було відібрано пацієнтки з різними показниками CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини.

Приклад №1. Пацієнтка № 7 у базі даних групи 3: жінка, 34 років, розмір пухлини T2 (у формулу поставимо 0), наявність метастазів у лімфатичні вузли N1 (у формулу поставимо 1), переважання різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (у формулу поставимо 1) і наявність одиничних структур з частковою ендотеліальною вистилкою (у формулу поставимо 2). Значення CD20 лімфоцитів на інвазивному краї = 6,77.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD20 лімфоцити на інвазивному краї} = 6,8260 - 0,1681 \times 0 + 0,0998 \times 1 - 0,0412 \times 1 - 0,0178 \times 2 = 6,85$$

Таким чином, отримане прогнозоване значення 6,85 є близьке до фактичного значення показника CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини у даної пацієнтки (різниця в 0,08 між значеннями цих показників є менше 5%).

Приклад №2. Пацієнтка № 12 у базі даних групи 3: жінка, 75 років, розмір пухлини T1 (у формулу поставимо 1), відсутність метастазів у лімфатичні вузли N0 (у формулу поставимо 0), переважання різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (у формулу поставимо 1) і відсутність структур з частковою ендотеліальною вистилкою (у формулу поставимо 1). Значення CD20 лімфоцитів на інвазивному краї = 6,52.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD20 лімфоцити на інвазивному краї} = 6,8260 - 0,1681 \times 1 + 0,0998 \times 0 - 0,0412 \times 1 - 0,0178 \times 1 = 6,60$$

Отже, отримане прогнозоване значення 6,60 є близьке до фактичного значення показника CD20 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини у даної пацієнтки (різниця в 0,08 між значеннями цих показників є менше 5%).

Приклад №3. Пацієнтка № 15 у базі даних групи 3: жінка, 74 років, розмір пухлини T2 (у формулу поставимо 0), відсутність метастазів у лімфатичні вузли N0 (у формулу поставимо 0), наявність тільки 2 типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (у формулу поставимо 0) і наявність одиничних структур з частковою ендотеліальною вистилкою (у формулу поставимо 2). Значення CD20 лімфоцитів на інвазивному краї = 6,71.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD20 лімфоцити на інвазивному краї} = 6,8260 - 0,1681 \times 0 + 0,0998 \times 0 - 0,0412 \times 0 - 0,0178 \times 2 = 6,79$$

Отримане прогнозоване значення 6,79 є близьке до фактичного значення показника CD20 лімфоцитів на інвазивному краї даної пацієнтки (різниця в 0,08 між значеннями цих показників є менше 5%).

Люмінальний В підтип (HER-2/neu-, Ki-67 \geq 20%) інфільтративного протокового раку грудної залози: прогнозування значення показників внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів (%)

Проведений мультифакторний регресійний аналіз між незалежними (клініко-патогістологічними факторними ознаками, n=39) та залежними (показником CD3 в/п лімфоцитів) предикторами у хворих на РГЗ з люмінальним В молекулярним підтипом (HER-2/neu-, Ki-67 \geq 20%, група 4), продемонстрував доведений сильний вплив чотирьох факторів: переважання п'яти різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (p=0,0002); ступінь диференціації пухлини G1 (p=0,0001); ступінь диференціації пухлини G3 (p=0,004); наявність множинних дилатованих

капілярів в пухлині ($p=0,028$). Коефіцієнт множинної кореляції становив $R=+0,87$, при $p=0,004$ (за Фішером $F=10,01$) та стандартній похибці оцінки (SEE – standard error of estimate) 1,00. У 69,38% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD3 внутрішньопухлинних (скоригований коефіцієнт множинної детермінації $R^2_{adj}=+0,69$).

Обраховані β -коефіцієнти цих факторів для формування моделі прогнозування значення показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів у пацієнток групи 4 наведено в таблиці 6.7.

Для підтвердження правильності побудованої моделі обраховували критерій автокореляції Дурбіна-Уотсона, який становив 1,57, що не виходить за межі норми 1,5-2,5, і підтверджує достовірність сформованої моделі.

Лінійне рівняння моделі логістичної регресії щодо прогнозованого значення CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів буде мати наступний вигляд:

$$\text{CD3 в/п лімфоцити} = 14,8464 - 5,0964 \times X_1 - 1,5198 \times X_2 + 5,3500 \times X_3 - 3,7967 \times X_4$$

За підрахунками середнє прогнозоване значення показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів складає $14,17 \pm 1,62$ (мінімальне значення 9,53, максимальне 15,01), що співпадає з фактичним середнім значенням $14,17 \pm 0,38$ у групі 4 (Люмінальний В молекулярний підтип).

Для оцінки ефективності створеної моделі було проведено ROC-аналіз із побудовою кривої (рис. 6.7).

Обчислена площа під ROC-кривою склала 99,12% ($AUC = 0,99$ [0,96-1,00] при $p=0,007$ та $SEE=0,02$), що відповідає «відмінній» якості створеної моделі згідно з експертною шкалою AUC.

Діагностична ефективність моделі підтверджена високими пороговими показниками чутливості (94,74%) та специфічності (100%).

Для перевірки роботи цієї моделі нами було відібрано пацієток з різними показниками CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів.

Таблиця 6.7

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів (Люмінальний В (HER-2/neu-, Ki-67 \geq 20%) молекулярний підтип)

Показники	Умовне позначення	β - коефіцієнти	SEE	t	p
Константа		14,8464	0,27	55,81	0,0000
G1 (1 – є, 0 – немає)	X1	-5,0964	1,03	-4,95	0,0001
Дилатовані _капіляри _множинні (1 – є, 0 – немає)	X2	-1,5198	0,63	-2,40	0,028
Переважаючі 5 типів структур (1 – є, 0 – немає)	X3	5,3500	1,15	4,65	0,0002
G3 (1 – є, 0 – немає)	X4	-3,7967	1,15	-3,30	0,004

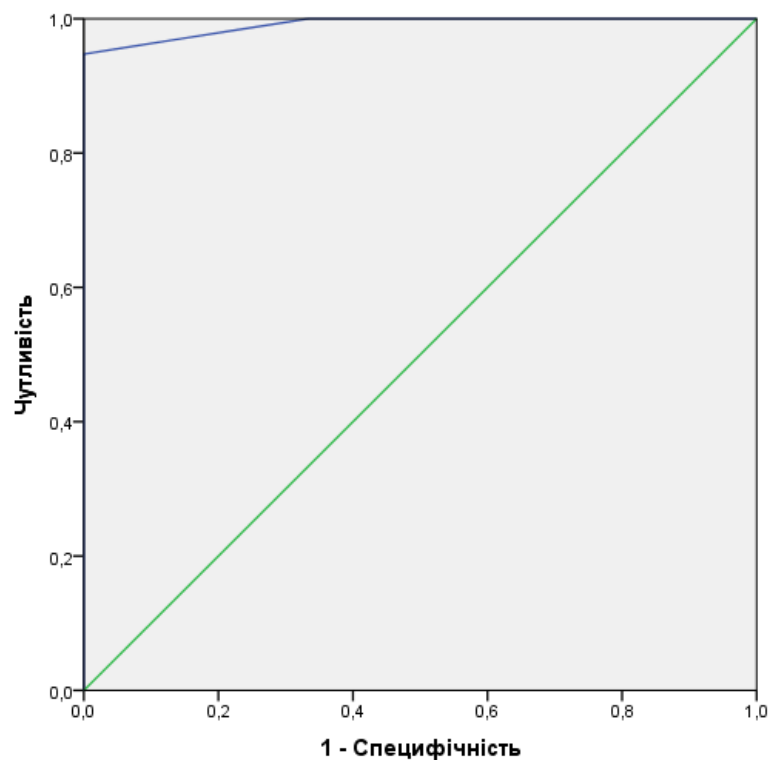


Рисунок 6.7 ROC-крива діагностичного тестування якості мультифакторної регресивної моделі показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів у пацієнтів з Люмінальним В молекулярним підтипом РГЗ

Приклад №1. Пацієнтка № 1 у базі даних групи 4: жінка, 41 рік, ступінь диференціації пухлини G1 (у формулу поставимо 0), наявність дилатованих множинних капілярів (у формулу поставимо 1), переважання різних п'яти типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (у формулу поставимо 0), ступінь диференціації пухлини G3 (у формулу поставимо 1). Значення CD3 в/п лімфоцитів = 9,53.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD3 в/п лімфоцити} = 14,8464 - 5,0964 \times 0 - 1,5198 \times 1 + 5,3500 \times 0 - 3,7967 \times 1 = 9,53$$

Отже, отримане прогнозоване значення 9,53 є ідентичним до фактичного значення показника в/п CD3 лімфоцитів даної пацієнтки.

Приклад №2. Пацієнтка № 2 у базі даних групи 4: жінка, 45 років, ступінь диференціації пухлини G1 (у формулу поставимо 1), наявність дилатованих множинних капілярів (у формулу поставимо 0), переважання різних п'яти типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (у формулу поставимо 0), ступінь диференціації пухлини G3 (у формулу поставимо 0). Значення CD3 в/п лімфоцитів = 9,75.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD3 в/п лімфоцити} = 14,8464 - 5,0964 \times 1 - 1,5198 \times 0 + 5,3500 \times 0 - 3,7967 \times 0 = 9,75$$

Отримане прогнозоване значення 9,75 є ідентичним до фактичного значення показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів даної пацієнтки.

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів у жінок з РГЗ групи 4 (Люмінальний В (HER-2/neu+) молекулярний підтип) крім вищевказаних показників, ще включали стадію пухлини. Причому ми використовували модель №5 для розрахунків.

Обраховані β -коефіцієнти цих факторів для формування моделі прогнозування значення показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів у пацієнток групи 4 наведено в таблиці 6.8.

Таблиця 6.8

Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів у жінок з РГЗ групи 4 (Люмінальний В (HER-2/neu+) молекулярний підтип)

Показники	Умовне позначення	β - коефіцієнти	SEE	t	p
Константа		14,8464	0,24	62,62	0,0000
G1 (1 – є, 0 – немає)	X1	-5,0964	0,92	-5,55	0,0000
Дилатовані _капіляри _множинні (1 – є, 0 – немає)	X2	-2,3614	0,67	-3,52	0,003
Переважаючі 5 типів структур (1 – є, 0 – немає)	X3	5,3500	1,02	5,22	0,0001
G3 (1 – є, 0 – немає)	X4	-2,9550	1,09	-2,72	0,015
T4 (1 – є, 0 – немає)	X5	2,5250	1,09	2,32	0,034

Для перевірки роботи цієї моделі наводимо приклад.

Приклад №3. Пацієнтка № 9 у базі даних групи 4: жінка, 36 років, ступінь диференціації пухлини G1 (у формулу поставимо 0), наявність дилатованих множинних капілярів (у формулу поставимо 1), переважання різних п'яти типів морфологічних структур в інвазивному компоненті (у формулу поставимо 0), ступінь диференціації пухлини G3 (у формулу поставимо 0), стадія пухлини T4 (у формулу поставимо 1). Значення CD3 в/п лімфоцитів = 15,01.

Підставивши ці дані пацієнтки у формулу моделі, отримуємо лінійне рівняння:

$$\text{CD3 в/п лімфоцити} = 14,8464 - 5,0964 \times 0 - 2,3614 \times 1 + 5,3500 \times 0 - 2,9550 \times 0 + 2,5250 \times 1 = 15,01$$

Таким чином, отримане прогнозоване значення 15,01 є ідентичним до фактичного значення показника CD3 в/п лімфоцитів даної пацієнтки.

Висновки до розділу 6

Визначення особливостей лімфоїдного мікрооточення пухлини є важливим кроком на шляху до потенційного використання пухлино-інфільтруючих лімфоцитів як недорогого біомаркера раку грудної залози з прогностичним і предиктивним потенціалом [253, 255].

Використання мультифакторного регресійного аналізу виявило суттєвий сильний вплив незалежних клініко-патогістологічних факторних ознак на рівень лімфоцитів (внутрішньопухлинних та на інвазивному краї) в люмінальних і нелюмінальних підтипах карцином грудної залози.

Потрійний негативний підтип вважається найбільш імуногенним підтипом РГЗ через більш високі рівні пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Прогнозування значення показників CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів та CD3 лімфоцитів на інвазивному краї в потрійному негативному підтипі інфільтративного протокового раку грудної залози показало, що у 81,44% випадків такі незалежні предиктори, як прямий вплив наявності атипових дилатованих капілярів ($p < 0,001$) і один тип структур в інвазивному компоненті ($p = 0,005$) та зворотній вплив наявності пухлини за розміром T1 ($p = 0,001$), будуть позначатися на показниках CD3 в/п лімфоцитів, а в 77,6% випадків мультифакторний регресійний аналіз продемонстрував сильний прямий вплив наявності пухлини за розміром T2 ($p = 0,013$) і ступеня диференціації пухлини G ($p = 0,0003$), зворотній вплив слабкої експресії COX-2 ($p < 0,00001$) на значення показника CD3 на інвазивному краї (скоригований коефіцієнт множинної детермінації $R^2_{adj} = +0,78$). Експресія пухлино-інфільтруючих лімфоцитів може передбачити відповідь на імунотерапію, на застосування інгібіторів імуних контрольних точок, незважаючи на те, що РГЗ історично вважався імуногенно сповільненим.

У хворих з Her-2/neu-позитивним молекулярним підтипом мультифакторний регресійний аналіз між незалежними клініко-патогістологічними факторними ознаками та показником CD20 на

інвазивному краї продемонстрував доведений сильний вплив трьох факторів: прямий вплив наявності в пухлині структур з частковою ендотеліальною вистилкою ($p=0,015$) і метастатичне ураження лімфатичних вузлів (N2, $p=0,0000$), зворотній вплив ступеня диференціації пухлини G2 ($p=0,004$). У 96,2% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD20 на інвазивному краї. У 98,3% випадків на значення показника CD56 внутрішньопухлинних лімфоцитів будуть мати вплив такі клініко-патогістологічні факторні ознаки як наявність в пухлині дилатованих капілярів ($p=0,0001$), метастатичне ураження лімфатичних вузлів N ($p=0,001$) і розмір пухлини T ($p=0,0000$). Пухлино-інфільтруючі лімфоцити можуть корелювати із покращенням прогнозу, а також із покращенням відповіді на трастузумаб і хіміотерапію, із збільшенням безрецидивної і загальної виживаності.

Проведений мультифакторний регресійний аналіз між незалежними клініко-патогістологічними факторними ознаками ($n=39$) та показником CD3 на інвазивному краї у хворих з люмінальним А підтипом інфільтративного протокового раку грудної залози показав доведений сильний вплив чотирьох факторів: ступінь диференціації пухлини (G, $p=0,0000$), метастатичне ураження лімфатичних вузлів (N2, $p=0,001$), розмір пухлини (T, $p=0,0000$) і локалізація пухлини. У 89,4% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD3 на інвазивному краї (скоригований коефіцієнт множинної детермінації $R^2_{adj}=+0,89$). Що стосується показника CD20 на інвазивному краї, то доведений сильний вплив таких чотирьох факторів, як розмір пухлини на стадії T1 ($p=0,0000$), метастатичне ураження лімфатичних вузлів (N, $p=0,0000$), переважання різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті ($p=0,0000$) і наявність структур з частковою ендотеліальною вистилкою ($p=0,037$). У 95,4% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD20 на інвазивному краї.

У пацієток з Люмінальним В підтипом (HER-2/neu–, Ki-67 \geq 20%) інфільтративного протокового раку грудної залози на прогнозування значення показників внутрішньопухлинних CD3 лімфоцитів мала вплив наявність різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті ($p=0,0002$); ступінь диференціації пухлини G1 ($p=0,0001$); ступінь диференціації пухлини G3 ($p=0,004$); наявність множинних дилатованих капілярів в пухлині ($p=0,028$). У 69,38% випадків ці незалежні предиктори будуть впливати на значення показника CD3 внутрішньопухлинних (скоригований коефіцієнт множинної детермінації $R^2_{adj}=+0,69$). Результати розрахунків логістичної регресії щодо прогнозування значення показника CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів у жінок з РГЗ групи 4 (Люмінальний В (HER-2/neu+) молекулярний підтип), крім вищевказаних показників, ще включали стадію пухлини. Люмінальні підтипи (особливо А підтип) вважаються найменш імуногенним підтипом РГЗ, що фактично пов'язано з нижчою середньою кількістю пухлино-інфільтруючих лімфоцитів. Крім того, гетерогенність люмінальних підтипів може характеризуватися різними прогнозами і ризиками рецидиву.

Лінійні рівняння побудованої логістичної моделі пройшли перевірки ефективності роботи після проведення розрахунків прогнозованих значень рівнів лімфоцитів (внутрішньопухлинних і на інвазивному краї) для різних за клініко-патогістологічними факторними ознаками та молекулярним підтипом досліджуваних пацієнтів.

Таким чином, регресійна мультифакторна модель дозволяє спрогнозувати значення показників CD3, CD20, CD56 для пацієнтів кожної групи залежно від поданих чинників, що має медичне та економічне значення, дасть змогу приймати оперативне рішення стосовно лікування без очікування результатів дороговартісних досліджень.

Результати дослідження, викладені у Розділі 6, опубліковані в наукових працях:

1. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози. Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu). 2021; Том 6, № 6 (34): 44-56. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.06.044>.
2. Volos LI, Dudash AP. Tumor-infiltrating lymphocytes in nonluminal invasive ductal breast carcinoma. Azerbaijan Medical Journal (Scopus: Q4). 2022; 1: 131–137. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.021>.
3. Волос Л.І., Дудаш А.П. Прогнозування значення показників CD3 лімфоцитів на інвазивному краї в потрійному негативному підтипі інфільтративного протокового раку грудної залози. Proceedings of the 7th International scientific and practical conference, March 29–31, 2023. BoScience Publisher. Boston, USA, 2023; 87-92.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі подано теоретичне обґрунтування та запропоновано нове вирішення актуального наукового завдання сучасної патоморфології та онкології – підвищення якості діагностики інфільтративного протокового раку грудної залози шляхом визначення клініко-морфологічних, ультраструктурних та імуногістохімічних особливостей молекулярних підтипів та встановлення їх зв'язку із прогностичними чинниками перебігу захворювання.

1. Рецепторний профіль люмінального підтипу А раку грудної залози є найпоширенішим та складає 40,93%, що майже у 2 рази більше від люмінального В підтипу (22,28%) та HER-2/neu+ (20,21%), і в 2,5 рази більше від потрійного негативного підтипу (16,58%). Між молекулярними підтипами існують статистично значущі відмінності щодо розміру пухлини (pT), регіонарних метастазів (pN), ступеня диференціації пухлин (G) та віку пацієнток на момент встановлення діагнозу.

2. Для інвазивного компоненту протокового раку грудної залози притаманна внутрішньопухлинна гетерогенність та структурні особливості молекулярних підтипів. Змішана морфологічна картина найчастіше діагностується у пухлинах люмінального А підтипу і переважає в 3,2 рази, ніж у пухлинах потрійного негативного підтипу, у 2,03 рази частіше діагностується, ніж в Her-2/neu+ раку грудної залози і в 1,41 рази – ніж у люмінальному В підтипу ($p < 0,05$). Достовірне переважання структур одного гістоархітектонічного типу виявляється у потрійному негативному РГЗ в 1,9 рази порівняно з Her-2/neu+, у 5 разів – порівняно з люмінальним А підтипом, в 4,4 рази – порівняно з люмінальним В підтипом ($p < 0,05$), наявність альвеолярних і солідних структур найчастіше діагностується у випадках з пухлинним ураженням лімфатичних вузлів в різних підтипах з G2 і G3 ($p < 0,05$).

Встановлено три варіанти поверхневої конфігурації пухлинних клітин протокового раку грудної залози залежно від ступеня диференціювання і гістологічної будови інвазивного компонента з урахуванням молекулярних підтипів. Перший варіант з численними асиметричними мікрворсинками з дифузним або вогнищевим їх розподілом на поверхні достовірно переважав за наявності тубулярних структур в інвазивному компоненті і ступеня градації G1 ($p < 0,05$) в люмінальному А підтипі. Другий варіант з малою кількістю асиметричних мікрворсинок, розсіяних по всій клітинній поверхні, діагностувався в солідному і трабекулярному інвазивному компонентах люмінальних та нелюмінальних підтипів зі ступенями злоякісності G2 і G3 ($p > 0,05$). Третій варіант з відсутністю у більшості пухлинних клітин мікрворсинок на поверхні переважав в альвеолярних структурах інвазивного компоненту в різних молекулярних підтипах, зі ступенями злоякісності G2 і G3 ($p > 0,05$).

3. Низька експресія Е-кадгерину чи її відсутність, яка спостерігається у 53,49% випадків раку грудної залози, асоціюється з пухлинами розміром ≥ 5 см, з ураженням лімфатичних вузлів N1-2, з G2 і G3 ступенями злоякісності і переважає в потрійному негативному підтипі (70%; $p = 0,011$). Високий рівень експресії Е-кадгерину переважає у люмінальному А підтипі (64%; $p = 0,023$) та достовірно прямо корелює з відсутністю метастатичного ураження лімфатичних вузлів N0 ($r = +0,48$; $p = 0,00002$) і високим ступенем диференціації G1 ($r = +0,23$; $p = 0,03$).

Надмірна експресія COX-2 визначається у пухлинах потрійного негативного (75%) та Her-2/neu+ підтипів (73,68%) у порівнянні з люмінальним А (20%) та люмінальним В (50%) підтипами. В карциномах потрійного негативного підтипу встановлено достовірний прямий помірний зв'язок між надекспресією COX-2 та N2 ($r = +0,38$; $p < 0,05$); у пухлинах з Her-2/neu+ підтипом достовірний помірний прямий зв'язок з N2 ($r = +0,57$; $p = 0,01$), низький рівень експресії COX-2 достовірно корелює з N0 ($r = +0,88$; $p = 0,0006$). Низький рівень експресії COX-2 визначається у 80% карцином люмінального

A підтипу, у пацієток пре- і постменопаузального віку ($p < 0,001$), помірно корелює з N0 ($r = +0,34$; $p < 0,05$) і N1 ($r = +0,32$; $p < 0,05$); достовірні прямі помірні та високі кореляційні зв'язки встановлено між надекспресією COX-2 та N2 ($r = +0,87$; $p = 0,00001$), G3 ($r = +0,59$; $p = 0,001$) у 20% карцином люмінального A підтипу. У сукупності надмірна експресія COX-2 асоціюється з метастатичним потенціалом пухлини.

Атипові дилатовані судини та структури з частковою ендотеліальною вистилкою є найбільш значущими ознаками з прогностичної точки зору. Множинні атипові дилатовані капіляри в інтратуморальній стромі мають помірні кореляційні зв'язки з N2 ($r = +0,40$; $p = 0,0001$), G3 ($r = +0,33$; $p = 0,002$) і переважають в потрійному негативному (40%) і HER-2/neu+ (26,32%) підтипах. Множинні структури з частковою ендотеліальною вистилкою корелюють з G2 ($r = +0,22$; $p = 0,046$) та G3 ($r = +0,30$; $p = 0,005$), з N2 ($r = +0,44$; $p < 0,00001$), значна кількість структур з частковою ендотеліальною вистилкою спостерігається в потрійному негативному підтипі ($p < 0,05$).

4. Найбільша щільність скупчень CD3- і CD20-лімфоцитів у внутрішньопухлинних ділянках і біля інвазивного краю в нелюмінальних підтипах у порівнянні з люмінальними A і B підтипами. CD20-клітинний інфільтрат на інвазивному краї переважав у пухлинах нелюмінального фенотипу, але в порівнянні зі щільністю CD3-лімфоцитів, був менш виражений в пухлинах як люмінального, так і нелюмінального фенотипів. Найменша щільність скупчень CD56-клітин серед пухлино-інфільтруючих лімфоцитів спостерігається внутрішньопухлинно в люмінальних підтипах. Відсоток інфільтратів CD3 і CD20 як всередині пухлинного вогнища, так і на інвазивному краї, а також CD56 на інвазивному краї значно нижчий при G1 і G2, ніж при G3 ($p < 0,01$). Відмінності в інфільтрації внутрішньопухлинних CD56 спостерігаються тільки між ступенем диференціації G2 і G3, причому між G1 і G2 відмінності статистично не значущі ($p > 0,05$).

5. Встановлено кореляційні парні та множинні (поєднані) взаємозв'язки між прогностичними змінними, які сприяють визначенню

перебігу захворювання. Для потрійного негативного підтипу характерні помірні парні кореляційні зв'язки між атипovими дилатованими капілярами і низькою експресією E-кадгерину ($r = +0,45$; $p = 0,05$), надекспресією COX-2 ($r = +0,60$; $p = 0,004$) і високі – з лімфоцитарною інфільтрацією всередині пухлини і на інвазивному краї: CD3 ($r = +0,76$; $p = 0,0001$ і $r = +0,72$; $p = 0,0003$, відповідно), CD20 ($r = +0,75$; $p = 0,0001$ і $r = +0,83$; $p = 0,0000004$, відповідно), CD56 ($r = +0,73$; $p = 0,0002$ і $r = +0,75$; $p = 0,0003$, відповідно). Встановлено множинний поєднаний взаємозв'язок, який демонструє, що в карциномах G3 потрійного негативного підтипу спостерігається низька експресія E-кадгеринів і зростає частка CD3 внутрішньопухлинних лімфоцитів. У люмінальному A підтипі встановлено поєднаний взаємозв'язок між високою експресією E-кадгерину, низькою щільністю CD3 лімфоцитів на інвазивному краї пухлини і морфологічною будовою інвазивного компонента переважно з двох різних типів структур.

6. Моделювання прогностичних рівнів пухлино-інфільтруючих лімфоцитів при різних молекулярних підтипах інфільтративного протокового раку грудної залози дає змогу спрогнозувати значення показників CD3, CD20, CD56 для пацієнтів кожної групи залежно від поданих чинників. У 77,6% випадків потрійного негативного підтипу наявність пухлини розміром T2 ($p = 0,013$), ступінь диференціації пухлини G ($p = 0,0003$) і високий рівень експресії COX-2 має прямий вплив на значення показника CD3 на інвазивному краї. У хворих з люмінальним A підтипом у 95,4% випадків доведений сильний вплив чотирьох незалежних предикторів на значення показника CD20 на інвазивному краї: стадія пухлини T1 ($p = 0,0000$), метастатичне ураження лімфатичних вузлів (N, $p < 0,0001$), переважання різних типів морфологічних структур в інвазивному компоненті ($p = 0,0000$) і наявність структур з частковою ендотеліальною вистилкою ($p = 0,037$).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Breast Cancer. WHO, 2021. <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/breast-cancer>
2. Бюлетень Національного канцер-реєстру № 24 - "Рак в Україні, 2021–2022. http://www.ncru.inf.ua/publications/BULL_24/index.htm
3. Bondar OV. Prognostic potential of proliferative activity index in assessing the effectiveness of complex neoadjuvant treatment of locally advanced breast cancer. *Journal of Education, Health, and Sport*. 2019; 9(9): 486-94.
4. Думанський ЮВ, Бондар ОВ, Янєва ДГ. Оцінка індексу проліферативної активності пухлини PCNA при різних варіантах поліхіміотерапії у пацієнток з місцево-розповсюдженим раком молочної залози. *Журнал Національної академії медичних наук України*. 2021;27(1):18–26. DOI: 10.37621/JNAMSU-2021-1-2.
5. Fernández-Tortolero Á, Reigosa-Yániz A. Subtypes of luminal breast carcinoma according to the Saint Gallen Consensus in a group of Venezuelan patients. *Biomedica*. 2021 Sep 22;41(3):531-40. doi: 10.7705/biomedica.5496
6. Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9793):771-84. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8
7. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005;365(9472):1687-1717. PMID: 15894097. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0
8. Erić I, Petek Erić A, Kristek J, Koprivčić I, Babić M. Breast cancer in young women: pathologic and immunohistochemical features. *Acta Clin Croat*. 2018 Sep;57(3):497-502. doi: 10.20471/acc.2018.57.03.13

9. Ehinger A, Malmström P, Bendahl PO, Elston CW, Falck AK, Forsare C, et al.; South and South-East Swedish Breast Cancer Groups. Histological grade provides significant prognostic information in addition to breast cancer subtypes defined according to St Gallen 2013. *Acta Oncol.* 2017 Jan;56(1):68-74. doi: [10.1080/0284186X.2016.1237778](https://doi.org/10.1080/0284186X.2016.1237778)
10. Volodko N, Gutor T, Petronchak O, Huley R, Dúcka M, Šmarda J, Borsig L, Beneš P, Knopfová L. Low infiltration of tumor-associated macrophages in high c-Myb-expressing breast tumors. *Sci Rep.* 2019 Aug 12;9(1):11634. doi: [10.1038/s41598-019-48051-1](https://doi.org/10.1038/s41598-019-48051-1).
11. Nguyen-Dumont T, Karpinski P, Sasiadek MM, Akopyan H, Steen JA, Theys D, Kitsera N. et al. Genetic testing in Poland and Ukraine: should comprehensive germline testing of BRCA1 and BRCA2 be recommended for women with breast and ovarian cancer? *Genetics Research.* Cambridge University Press; 2020;102: e6.
12. Lytvynenko MV, Narbutova TY, Oliynyk NN. Estrogen and progesterone receptors in endometrial, cervical and breast tissues in immunodeficient conditions. *Azerbaijan Med J.* 2021; 3:70-77. doi: [10.34921/amj.2021.3.010](https://doi.org/10.34921/amj.2021.3.010)
13. Vynnychenko IO, Pryvalova AO, Vynnychenko OI, Lyndin MS, Sikora VV, Romaniuk AM. PIK3CA-mutant circulating tumor DNA in patients with breast cancer. *Azerbaijan Medical Journal.* 2020; 3:79-88. doi: [10.34921/amj.2020.3.010](https://doi.org/10.34921/amj.2020.3.010)
14. Линдін МС, Романюк АМ. Інвазивний рак неспецифічного типу молочної залози: гістологічні та імуногістохімічні особливості. *Challenges of medical science and education: an experience of EU countries and practical introduction in Ukraine: Collective monograph.* Riga: Izdevniecība "Baltija Publishing", 2020. 264-281. DOI <https://doi.org/10.30525/978-9934-588-64-8-15>
15. Alkabban FM, Ferguson T. Breast Cancer. 2021 Aug 7. In: *StatPearls [Internet].* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. PMID: 29493913.
16. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanisławek A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers,

- and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021 Aug 25;13(17):4287. doi: 10.3390/cancers13174287.
17. Siegel RL, Miller KD, Fuchs H, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin*. 2021; 71: 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
 18. Breast cancer burden in EU-27 in 2020. https://ecis.jrc.ec.europa.eu/pdf/Breast_cancer_factsheet-Oct_2020.pdf
 19. Tan PH, Ellis I, Allison K, Brogi E, Fox SB, Lakhani S, Lazar AJ, Morris EA, Sahin A, Salgado R. et al. WHO Classification of Tumours Editorial Board. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020; 77: 181-5. doi: [10.1111/his.14091](https://doi.org/10.1111/his.14091)
 20. WHO Breast Tumours. WHO Classification of Tumours (Fifth Edition), Volume 2, WHO (2019). [Google Scholar](#)
 21. Dieci MV, Orvieto E, Dominici M, Conte P, Guarneri V. Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist*. 2014; 19: 805-13. doi: [10.1634/theoncologist.2014-0108](https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0108)
 22. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van't Veer LJ, Peterse JL. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008 Oct;216(2):141-50. doi: [10.1002/path.2407](https://doi.org/10.1002/path.2407)
 23. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):192-208. doi: [10.1016/j.molonc.2010.04.004](https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004).
 24. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. doi: [10.1038/35021093](https://doi.org/10.1038/35021093).
 25. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc*

- Natl Acad Sci U S A. 2001 Sep 11;98(19):10869-74. doi: 10.1073/pnas.191367098.
- 26.Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160-7. doi: 10.1200/JCO.2008.18.1370.
- 27.Chia SK, Bramwell VH, Tu D, Shepherd LE, Jiang S, Vickery T, Mardis E, Leung S, Ung K, Pritchard KI, Parker JS, Bernard PS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. A 50-gene intrinsic subtype classifier for prognosis and prediction of benefit from adjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res*. 2012 Aug 15;18(16):4465-72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0286.
- 28.Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):61-70. doi: 10.1038/nature11412.
- 29.Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018 Jan;27(1):95-120. doi: 10.1016/j.soc.2017.08.005.
- 30.Cheang MC, van de Rijn M, Nielsen TO. Gene expression profiling of breast cancer. *Annu Rev Pathol*. 2008; 3: 67-97. doi: 10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151505.
- 31.Viale G, Regan MM, Mastropasqua MG, Maffini F, Maiorano E. et al.; International Breast Cancer Study Group. Predictive value of tumor Ki-67 expression in two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008 Feb 6;100(3):207-12. doi: 10.1093/jnci/djm289.
- 32.Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009 May 20;101(10):736-50. doi: 10.1093/jnci/djp082.
- 33.Raica M, Jung I, Cimpean AM, Suciuc C, Muresan AM. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Rom J Morphol Embryol*. 2009; 50: 5-13.

34. Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, Ellis M, Henry NL, Hugh JC, Lively T, McShane L, Paik S, Penault-Llorca F, Prudkin L, Regan M, Salter J, Sotiriou C, Smith IE, Viale G, Zujewski JA, Hayes DF; International Ki-67 in Breast Cancer Working Group. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Nov 16;103(22):1656-64. doi: 10.1093/jnci/djr393.
35. Sana M, Malik HJ. Current and emerging breast cancer biomarkers. *J Cancer Res Ther.* 2015 Jul-Sep;11(3):508-13. doi: 10.4103/0973-1482.163698.
36. Loehberg CR, Almstedt K, Jud SM, Haeberle L, Fasching PA, Hack CC, Lux MP, Thiel FC, Schrauder MG, Brunner M, Bayer CM, Hein A, Heusinger K, Heimrich J, Bani MR, Renner SP, Hartmann A, Beckmann MW, Wachter DL. Prognostic relevance of Ki-67 in the primary tumor for survival after a diagnosis of distant metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Apr;138(3):899-908. doi: 10.1007/s10549-013-2460-y.
37. Brisken C, Hess K, Jeitziner R. Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis. *Endocrinology.* 2015 Oct;156(10):3442-50. doi: 10.1210/en.2015-1392.
38. Lafourcade A, His M, Baglietto L, Boutron-Ruault MC, Dossus L, Rondeau V. Factors associated with breast cancer recurrences or mortality and dynamic prediction of death using history of cancer recurrences: the French E3N cohort. *BMC Cancer.* 2018 Feb 9;18(1):171. doi: 10.1186/s12885-018-4076-4.
39. La Rosa P, Acconcia F. Signaling functions of ubiquitin in the 17 β -estradiol (E2): estrogen receptor (ER) α network. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011 Nov;127(3-5):223-30. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.07.008.
40. Liu R, Guo CX, Zhou HH. Network-based approach to identify prognostic biomarkers for estrogen receptor-positive breast cancer treatment with tamoxifen. *Cancer Biol Ther.* 2015; 16(2): 317-24. doi:10.1080/15384047.2014.1002360

41. Untch M, Gerber B, Harbeck N, Jackisch C, Marschner N, Möbus V, von Minckwitz G, Loibl S, Beckmann MW, Blohmer JU, Costa SD, Decker T, Diel I, Dimpfl T, Eiermann W, Fehm T, Friese K, Jänicke F, Janni W, Jonat W, Kiechle M, Köhler U, Lück HJ, Maass N, Possinger K, Rody A, Scharl A, Schneeweiss A, Thomssen C, Wallwiener D, Welt A. 13th St. Gallen international breast cancer conference 2013: primary therapy of early breast cancer evidence, controversies, consensus - opinion of a German team of experts (Zurich 2013). *Breast Care (Basel)*. 2013 Jun;8(3):221-9. doi: 10.1159/000351692.
42. Sestak I, Buus R, Cuzick J. Comparison of the Performance of 6 Prognostic Signatures for Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018;4(4):545–53. doi:10.1001/jamaoncol.2017.5524
43. Untch M, Thomssen C. Clinical practice decisions in endocrine therapy. *Cancer Invest*. 2010;28 Suppl 1:4-13. doi: 10.3109/07357907.2010.501637. PMID: 20653403.
44. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG); Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011 Aug 27;378(9793):771-84. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8.
45. Glassman D, Hignett S, Rehman S, Linforth R, Salhab M. Adjuvant Endocrine Therapy for Hormone-positive Breast Cancer, Focusing on Ovarian Suppression and Extended Treatment: An Update. *Anticancer Res*. 2017 Oct;37(10):5329-5341. doi: 10.21873/anticancer.11959.
46. Criscitiello C, Disalvatore D, De Laurentiis M, Gelao L, Fumagalli L, Locatelli M, Bagnardi V, Rotmensz N, Esposito A, Minchella I, De Placido S, Santangelo M, Viale G, Goldhirsch A, Curigliano G. High Ki-67 score is indicative of a greater benefit from adjuvant chemotherapy when added to endocrine therapy in

- luminal B HER2 negative and node-positive breast cancer. *Breast*. 2014 Feb;23(1):69-75. doi: 10.1016/j.breast.2013.11.007.
47. Iqbal N, Iqbal N. Human epidermal growth factor receptor 2 (her2) in cancers: overexpression and therapeutic implications. *Mol Biol Int*. 2014. Article ID 852748. doi:10.1155/2014/852748.
48. Kasangian AA, Gherardi G, Biagioli E, Torri V, Moretti A, Bernardin E, Cordovana A, Farina G, Bramati A, Piva S, Dazzani MC, Paternò E, La Verde NM. The prognostic role of tumor size in early breast cancer in the era of molecular biology. *PLoS One*. 2017 Dec 6;12(12):e0189127. doi: 10.1371/journal.pone.0189127.
49. Schroeder RL, Stevens CL, Sridhar J. Small molecule tyrosine kinase inhibitors of ErbB2/HER2/Neu in the treatment of aggressive breast cancer. *Molecules*. 2014 Sep 23;19(9):15196-212. doi: 10.3390/molecules190915196.
50. Yeo W, Luk MY, Soong IS, Yuen TY, Ng TY, Mo FK, Chan K, Wong SY, Tsang J, Leung C, Suen JJ, Ngan RK. Efficacy and tolerability of trastuzumab emtansine in advanced human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *Hong Kong Med J*. 2018 Feb;24(1):56-62. doi: 10.12809/hkmj176808.
51. Lee HJ, Seo AN, Kim EJ, Jang MH, Kim YJ, Kim JH, Kim SW, Ryu HS, Park IA, Im SA, Gong G, Jung KH, Kim HJ, Park SY. Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer*. 2015 Jan 6;112(1):103-11. doi: 10.1038/bjc.2014.556.
52. Awada G, Gombos A, Aftimos P, Awada A. Emerging drugs targeting human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2016;21(1):91-101. doi: 10.1517/14728214.2016.1146680.
53. de Melo Gagliato D, Jardim DL, Marchesi MS, Hortobagyi GN. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget*. 2016 Sep 27;7(39):64431-64446. doi: 10.18632/oncotarget.7043.

54. Morigi C. Highlights from the 15th St Gallen International Breast Cancer Conference 15-18 March, 2017, Vienna: tailored treatments for patients with early breast cancer. *Ecancermedicalscience*. 2017 Apr 7;11:732. doi: 10.3332/ecancer.2017.732.
55. Singla H, Ludhiadch A, Kaur RP, Chander H, Kumar V, Munshi A. Recent advances in HER2 positive breast cancer epigenetics: Susceptibility and therapeutic strategies. *Eur J Med Chem*. 2017 Dec 15; 142:316-327. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.07.075.
56. Tan DS, Marchiό C, Jones RL, Savage K, Smith IE, Dowsett M, Reis-Filho JS. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Sep;111(1):27-44. doi: 10.1007/s10549-007-9756-8.
57. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010 Nov 11;363(20):1938-48. doi: 10.1056/NEJMra1001389.
58. Raica M, Jung I, Cimpean AM, Suciuc C, Muresan AM. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? *Rom J Morphol Embryol*. 2009; 50: 5-13.
59. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod Pathol*. 2010 Jan;23(1):123-33. doi: 10.1038/modpathol.2009.145.
60. Zaha, Dana & Lazăr, Elena & Lazureanu, Codruta. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2010; 51:85-9. <https://www.researchgate.net/publication/41623705>
61. Negi P, Kingsley PA, Jain K, Sachdeva J, Srivastava H, Marcus S, Pannu A. Survival of Triple Negative versus Triple Positive Breast Cancers: Comparison and Contrast. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(8):3911-6. PMID: 27644638.

62. Yadav BS, Chanana P, Jhamb S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J Clin Oncol.* 2015 Dec 10;6(6):252-63. doi: 10.5306/wjco.v6.i6.252.
63. Rubovszky G, Udvarhelyi N, Horváth Z, Láng I, Kásler M. A tripla-negatív emlőkarcinóma--irodalmi áttekintés [Triple-negative breast carcinoma--review of current literature]. *Magy Onkol.* 2010 Dec;54(4):325-35. Hungarian. doi: 10.1556/MOnkol.54.2010.4.6.
64. Orrantia-Borunda E, Anchondo-Nuñez P, Acuña-Aguilar LE, Gómez-Valles FO, Ramírez-Valdespino CA. Subtypes of Breast Cancer. In: Mayrovitz HN, editor. *Breast Cancer* [Internet]. Brisbane (AU): Exon Publications; 2022 Aug 6. Chapter 3. DOI: [10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes](https://doi.org/10.36255/exon-publications-breast-cancer-subtypes)
65. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, Safari E, Farahmand L. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol.* 2020 Jul; 84:106535. doi: 10.1016/j.intimp.2020.106535.
66. Волос ЛІ, Дудаш АП. Молекулярний тип раку грудної залози як прогностичний фактор метастазування. Науковий журнал «Медичний форум», 2019; 17(17): 18-20. http://www.medicinelviv.org.ua/archive/2019/17_2019.pdf
67. Волос ЛІ, Дудаш АП. Молекулярна гетерогенність потрійно-негативного раку грудної залози як прогностичний чинник перебігу. Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI ст.»; Львів, 22–23 травня 2020 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2020, с.17-21.
68. Сивак ЛА, Верьовкіна НО, Лялькін СА. Прогностичні фактори при раку грудної залози. Сучасний стан проблеми. *Клінічна онкологія.* 2014; 4 (16): 46–9. <https://www.clinicaloncology.com.ua/wp/wp-content/uploads/2015/02/399.pdf>
69. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A,

- Schnitt SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000 Jul;124(7):966-78. doi: 10.5858/2000-124-0966-PFIBC.
70. Partridge AH, Hughes ME, Warner ET, Ottesen RA, Wong YN, Edge SB, Theriault RL, Blayney DW, Niland JC, Winer EP, Weeks JC, Tamimi RM. Subtype-Dependent Relationship Between Young Age at Diagnosis and Breast Cancer Survival. *J Clin Oncol.* 2016 Sep 20;34(27):3308-14. doi: 10.1200/JCO.2015.65.8013.
71. Lian W, Fu F, Lin Y, Lu M, Chen B, Yang P, Zeng B, Huang M, Wang C. The Impact of Young Age for Prognosis by Subtype in Women with Early Breast Cancer. *Sci Rep.* 2017 Sep 14;7(1):11625. doi: 10.1038/s41598-017-10414-x.
72. Liu Z, Sahli Z, Wang Y, Wolff AC, Cope LM, Umbricht CB. Young age at diagnosis is associated with worse prognosis in the Luminal A breast cancer subtype: a retrospective institutional cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2018; 172:689–702. doi: 10.1007/s10549-018-4950-4.
73. Liedtke C, Rody A, Gluz O, Baumann K, Beyer D, Kohls EB, Lausen K, Hankaer L, Holtrich U, Becker S, Karn T. The prognostic impact of age in different molecular subtypes of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015 Aug;152(3):667-73. doi: 10.1007/s10549-015-3491-3.
74. Dai D, Zhong Y, Wang Z, Yousafzai NA, Jin H, Wang X. The prognostic impact of age in different molecular subtypes of breast cancer: a population-based study. *PeerJ.* 2019 Jul 4;7: e7252. doi: 10.7717/peerj.7252.
75. Fredholm H, Eaker S, Frisell J, Holmberg L, Fredriksson I, Lindman H. Breast cancer in young women: poor survival despite intensive treatment. *PLoS One.* 2009 Nov 11;4(11):e7695. doi: 10.1371/journal.pone.0007695.
76. Zhong W, Tan L, Jiang WG, Chen K, You N, Sanders AJ, Liang G, Liu Z, Ling Y, Gong C. Effect of younger age on survival outcomes in T1N0M0 breast cancer: A propensity score matching analysis. *J Surg Oncol.* 2019 Jun;119(8):1039-46. doi: 10.1002/jso.25457.

77. Azim HA Jr, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, Haibe-Kains B, Piccart MJ, Sotiriou C, Loi S. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res.* 2012 Mar 1;18(5):1341-51. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2599.
78. Morrison DH, Rahardja D, King E, Peng Y, Sarode VR. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2012 Jul 10;107(2):382-7. doi: 10.1038/bjc.2012.219.
79. Axelrod DE, Shah K, Yang Q, Haffty BG. Prognosis for Survival of Young Women with Breast Cancer by Quantitative p53 Immunohistochemistry. *Cancer Clin Oncol.* 2012;1(1):52-64. doi: 10.5539/cc.v1n1p52.
80. Ahn SH, Son BH, Kim SW, Kim SI, Jeong J, Ko SS, Han W; Korean Breast Cancer Society. Poor outcome of hormone receptor-positive breast cancer at very young age is due to tamoxifen resistance: nationwide survival data in Korea--a report from the Korean Breast Cancer Society. *J Clin Oncol.* 2007 Jun 10;25(17):2360-8. doi: 10.1200/JCO.2006.10.3754.
81. Kim SW, Chun M, Han S, Jung YS, Choi JH, Kang SY, Yim H, Kang SH. Young Age Is Associated with Increased Locoregional Recurrence in Node-Positive Breast Cancer with Luminal Subtypes. *Cancer Res Treat.* 2017 Apr;49(2):484-93. doi: 10.4143/crt.2016.246.
82. El Sayed R, El Jamal L, El Iskandarani S, Kort J, Abdel Salam M, Assi H. Endocrine and Targeted Therapy for Hormone-Receptor-Positive, HER2-Negative Advanced Breast Cancer: Insights to Sequencing Treatment and Overcoming Resistance Based on Clinical Trials. *Front Oncol.* 2019 Jun 21;9:510. doi: 10.3389/fonc.2019.00510.
83. Cai S, Zuo W, Lu X, Gou Z, Zhou Y, Liu P, Pan Y and Chen S. The Prognostic Impact of Age at Diagnosis Upon Breast Cancer of Different Immunohistochemical Subtypes: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Population-Based Analysis. *Front. Oncol.* 2020; 10:1729. doi: 10.3389/fonc.2020.01729

84. Torregrosa-Maicas MD, Del Barco-Berrón S, Cotes-Sanchís A, Lema-Roso L, Servitja-Tormo S, Gironés-Sarrió R. Expert consensus to optimize the treatment of elderly patients with luminal metastatic breast cancer. *Clin Transl Oncol*. 2022 Jun;24(6):1033-46. doi: 10.1007/s12094-021-02766-8.
85. Simon MS, Beebe-Dimmer JL, Hastert TA, Manson JE, Cespedes Feliciano EM, Neuhouser ML, Ho GYF, Freudenheim JL, Strickler H, Ruterbusch J, Barac A, Chlebowski R, Caan B. Cardiometabolic risk factors and survival after breast cancer in the Women's Health Initiative. *Cancer*. 2018 Apr 15;124(8):1798-1807. doi: 10.1002/cncr.31230.
86. Kirkham AA, Beaudry RI, Paterson DI, Mackey JR, Haykowsky MJ. Curing breast cancer and killing the heart: A novel model to explain elevated cardiovascular disease and mortality risk among women with early stage breast cancer. *Prog Cardiovasc Dis*. 2019 Mar-Apr;62(2):116-126. doi: 10.1016/j.pcad.2019.02.002.
87. Groot G, Rees H, Pahwa P, Kanagaratnam S, Kinloch M. Predicting local recurrence following breast-conserving therapy for early stage breast cancer: the significance of a narrow (≤ 2 mm) surgical resection margin. *J Surg Oncol*. 2011 Mar 1;103(3):212-6. doi: 10.1002/jso.21826.
88. Lindquist D, Hellberg D, Tot T. Disease Extent ≥ 4 cm Is a Prognostic Marker of Local Recurrence in T1-2 Breast Cancer. *Patholog Res Int*. 2011;2011:860584. doi: 10.4061/2011/860584.
89. Rezo A, Dahlstrom J, Shadbolt B, Rodins K, Zhang Y, Davis AJ; ACT & SENSW BCTG. Tumor size and survival in multicentric and multifocal breast cancer. *Breast*. 2011 Jun;20(3):259-63. doi: 10.1016/j.breast.2011.01.005.
90. Siponen ET, Vaalavirta L, Joensuu H, Vironen J, Heikkilä P, Leidenius MH. Ipsilateral breast recurrence after breast conserving surgery in patients with small (≤ 2 cm) breast cancer treated with modern adjuvant therapies. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Jan;37(1):25-31. doi: 10.1016/j.ejso.2010.11.003.
91. Gentilini O, Veronesi P, Botteri E, Soggiu F, Trifirò G, Lissidini G, Galimberti V, Musmeci S, Raviele PR, Toesca A, Ratini S, Del Castillo A, Colleoni M,

- Talakhadze N, Rotmensz N, Viale G, Veronesi U, Luini A. Sentinel lymph node biopsy in multicentric breast cancer: five-year results in a large series from a single institution. *Ann Surg Oncol*. 2011 Oct;18(10):2879-84. doi: 10.1245/s10434-011-1694-3.
92. Weissenbacher TM, Zschage M, Janni W, Jeschke U, Dimpfl T, Mayr D, Rack B, Schindlbeck C, Friese K, Dian D. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumor-node-metastasis classification justified? *Breast Cancer Research and Treatment*, 2010; 122 (1):27-34. doi:10.1007/s10549-010-0917-9. PMID: 20612984
93. Bernet L, Cano R, Martinez M, Dueñas B, Matias-Guiu X, Morell L, Palacios J, Rezola R, Robles-Frias M, Ruiz I, Velasco A, Vieites B, Sevilla F, Torro J, Medrano J, Ballester B. Diagnosis of the sentinel lymph node in breast cancer: a reproducible molecular method: a multicentric Spanish study. *Histopathology*. 2011 May;58(6):863-9. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03836.x.
94. Cabioglu N, Ozmen V, Kaya H, Tuzlali S, Igci A, Muslumanoglu M, Kecer M, Dagoglu T. Increased lymph node positivity in multifocal and multicentric breast cancer. *J Am Coll Surg*. 2009 Jan;208(1):67-74. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2008.09.001.
95. Gupta R, Babb JS, Singh B, Chiriboga L, Liebes L, Adams S, Demaria S. The numbers of FoxP3+ lymphocytes in sentinel lymph nodes of breast cancer patients correlate with primary tumor size but not nodal status. *Cancer Invest*. 2011 Jul;29(6):419-25. doi: 10.3109/07357907.2011.585193.
96. Kai K, Arima N, Miyayama H, Yamamoto Y, Iwase H, Nishimura R. Pathological lymph node involvement at surgery is a significant predictive factor of recurrence in locally advanced breast cancer treated with concomitant epirubicin-docetaxel neoadjuvant chemotherapy: a cohort study. *Breast Cancer*. 2009;16(1):42-8. doi: 10.1007/s12282-008-0055-y.
97. Lo YF, Cheung YC, Hsueh S, Ho KC. Feasibility of sentinel lymph node biopsy in multifocal/multicentric breast cancer. *Chang Gung Med J*. 2009 Jan-Feb;32(1):51-8. PMID: 19292939.

98. Vujovic O, Yu E, Cherian A, Dar AR, Stitt L, Perera F. The number of axillary nodes removed as a predictor of regional recurrence in node negative breast cancer. *Radiother Oncol.* 2009 Apr;91(1):38-41. doi: 10.1016/j.radonc.2008.05.003.
99. Wetstein SC, de Jong VMT, Stathonikos N, Opdam M, Dackus GMHE, Pluim JPW, van Diest PJ, Veta M. Deep learning-based breast cancer grading and survival analysis on whole-slide histopathology images. *Sci Rep.* 2022 Sep 6;12(1):15102. doi: 10.1038/s41598-022-19112-9.
100. Jaroensri R, Wulczyn E, Hegde N, Brown T, Flament-Auvigne I, Tan F, Cai Y, Nagpal K, Rakha EA, Dabbs DJ, Olson N, Wren JH, Thompson EE, Seetao E, Robinson C, Miao M, Beckers F, Corrado GS, Peng LH, Mermel CH, Liu Y, Steiner DF, Chen PC. Deep learning models for histologic grading of breast cancer and association with disease prognosis. *NPJ Breast Cancer.* 2022 Oct 4;8(1):113. doi: 10.1038/s41523-022-00478-y.
101. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009 Jan;45(2):228-47. doi: 10.1016/j.ejca.2008.10.026.
102. Jiang P, Chen Y, Liu B. Prognostic Efficacy of Tumor-Stroma Ratio in Women With Breast Cancer: A Meta-Analysis of Cohort Studies. *Front Oncol.* 2021 Dec 16;11:731409. doi: 10.3389/fonc.2021.731409.
103. Gagliano T, Shah K, Gargani S, Lao L, Alsaleem M, Chen J, Ntafis V, Huang P, Ditsiou A, Vella V, Yadav K, Bienkowska K, Bresciani G, Kang K, Li L, Carter P, Benstead-Hume G, O'Hanlon T, Dean M, Pearl FM, Lee SC, Rakha EA, Green AR, Kontoyiannis DL, Song E, Stebbing J, Giamas G. PIK3C δ expression by fibroblasts promotes triple-negative breast cancer progression. *J Clin Invest.* 2020 Jun 1;130(6):3188-3204. doi: 10.1172/JCI128313.
104. Clocchiatti A, Ghosh S, Procopio MG, Mazzeo L, Bordignon P, Ostano P, Goruppi S, Bottoni G, Katarkar A, Levesque M, Kölblinger P, Dummer R, Neel

- V, Özdemir BC, Dotto GP. Androgen receptor functions as transcriptional repressor of cancer-associated fibroblast activation. *J Clin Invest*. 2018 Dec 3;128(12):5531-5548. doi: 10.1172/JCI99159.
105. Micke P, Strell C, Mattsson J, Martín-Bernabé A, K, Mezheyeuski A. The prognostic impact of the tumour stroma fraction: A machine learning-based analysis in 16 human solid tumour types. *EBioMedicine*. 2021 Mar; 65:103269. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103269.
106. Wu J, Liang C, Chen M, Su W. Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016 Oct 18;7(42):68954-68965. doi: 10.18632/oncotarget.12135.
107. Bellati F, Napoletano C, Gasparri ML, Panici PB, Nuti M. Immunologic systemic effect of neoadjuvant chemotherapy requires investigation before tumor-associated lymphocytes can be introduced in breast cancer treatment algorithm. *J Clin Oncol*. 2010 Sep 20;28(27):e471-2; author reply e473. doi: 10.1200/JCO.2010.27.9984.
108. Calabrò A, Beissbarth T, Kuner R, Stojanov M, Benner A, Asslaber M, Ploner F, Zatloukal K, Samonigg H, Poustka A, Sültmann H. Effects of infiltrating lymphocytes and estrogen receptor on gene expression and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Jul;116(1):69-77. doi: 10.1007/s10549-008-0105-3.
109. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 1;28(1):105-13. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370.
110. Baker K, Lachapelle J, Zlobec I, Bismar TA, Terracciano L, Foulkes WD. Prognostic significance of CD8+ T lymphocytes in breast cancer depends upon both oestrogen receptor status and histological grade. *Histopathology*. 2011 Jun;58(7):1107-16. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.03846.x.

111. Cole SW. Chronic inflammation and breast cancer recurrence. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 20;27(21):3418-9. doi: 10.1200/JCO.2009.21.9782.
112. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AH, Ellis IO, Green AR. Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011 May 20;29(15):1949-55. doi: 10.1200/JCO.2010.30.5037.
113. Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, Szewczyk K, Staszek U, Pudelko M, Szynglarewicz B, Szelachowska J, Zolnierek A, Kornafel J. The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer Res.* 2009 Jul;29(7):2445-51. PMID: 19596912.
114. Li CH, Kuo WH, Chang WC, Huang SC, Chang KJ, Sheu BC. Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer. *Immunol Res.* 2011 Oct;51(1):71-9. doi: 10.1007/s12026-011-8242-x.
115. Blok E, Engels C, Jongste E, Dekker-Ensink G, Kroep J, Kuppen P, Van de Velde C. Tumour infiltrating lymphocytes as a predictive factor for the response to adjuvant endocrine therapy in early breast. *European Journal of Cancer.* 2015; 51: S323-S323. Copyright ©2015 European Cancer Congress.
116. Mahmoud SM, Lee AH, Paish EC, Macmillan RD, Ellis IO, Green AR. The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Apr;132(2):545-53. doi: 10.1007/s10549-011-1620-1
117. Ascierto ML, Idowu MO, Zhao Y, Khalak H, Payne KK, Wang XY, Dumur CI, Bedognetti D, Tomei S, Ascierto PA, Shanker A, Bear HD, Wang E, Marincola FM, De Maria A, Manjili MH. Molecular signatures mostly associated with NK cells are predictive of relapse free survival in breast cancer patients. *J Transl Med.* 2013 Jun 12;11:145. doi: 10.1186/1479-5876-11-145.
118. Ismagilov AKh, Khuzina DR, Vanesyan AS, Zaysteva VV. The role of biomarkers in the early diagnostics of breast cancer. *Opukholi zhenskoy*

reproduktivnoy systemy = Tumors of female reproductive system
2020;16(4):35–40. DOI: 10.17650/1994-4098-2020-16-4-35-40

119. Gligorov J, Pivot XB, Jacot W, Naman HL, Spaeth D, Misset JL, Largillier R, Sautiere JL, de Roquancourt A, Pomel C, Rouanet P, Rouzier R, Penault-Llorca FM; Francilian Breast Intergroup. Prospective Clinical Utility Study of the Use of the 21-Gene Assay in Adjuvant Clinical Decision Making in Women with Estrogen Receptor-Positive Early Invasive Breast Cancer: Results From the SWITCH Study. *Oncologist*. 2015 Aug;20(8):873-9. doi: 10.1634/theoncologist.2014-0467.
120. Curtit E, Mansi L, Maissonette-Escot Y, Sautière JL, Pivot X. Prognostic and predictive indicators in early-stage breast cancer and the role of genomic profiling: Focus on the Oncotype DX® Breast Recurrence Score Assay. *Eur J Surg Oncol*. 2017 May; 43(5): 921-930. doi: 10.1016/j.ejso.2016.11.016.
121. Blok EJ, Bastiaannet E, van den Hout WB, Liefers GJ, Smit VTHBM, Kroep JR, van de Velde CJH. Systematic review of the clinical and economic value of gene expression profiles for invasive early breast cancer available in Europe. *Cancer Treat Rev*. 2018 Jan; 62:74-90. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.10.012.
122. Xin L, Liu YH, Martin TA, Jiang WG. The Era of Multigene Panels Comes? The Clinical Utility of Oncotype DX and MammaPrint. *World J Oncol*. 2017 Apr;8(2):34-40. doi: 10.14740/wjon1019w.
123. Querzoli P, Coradini D, Pedriali M, Boracchi P, Ambrogi F, Raimondi E, La Sorda R, Lattanzio R, Rinaldi R, Lunardi M, Frasson C, Modesti F, Ferretti S, Piantelli M, Iacobelli S, Biganzoli E, Nenci I, Alberti S. An immunohistochemically positive E-cadherin status is not always predictive for a good prognosis in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2010 Dec 7;103(12):1835-9. doi: 10.1038/sj.bjc.6605991.
124. Yamashita M, Ogawa T, Zhang X, Hanamura N, Kashikura Y, Takamura M, Yoneda M, Shiraishi T. Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer*. 2012;19(2):170-6. doi:10.1007/s12282-010-0234-5.

125. Abdollahi A, Ensani F, Maleki Z, Iravanlo G, Ashtari A. Differential expression of e-cadherin in lobular and ductal carcinoma of breast in an Iranian Cancer Care Hospital. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 2011;27(1):56-9. <https://pjms.com.pk/index.php/pjms/article/view/810>
126. Walker RA, Hanby A, Pinder SE, Thomas J, Ellis IO; National Coordinating Committee for Breast Pathology Research Subgroup. Current issues in diagnostic breast pathology. *J Clin Pathol*. 2012 Sep;65(9):771-85. doi: 10.1136/jclinpath-2012-200733.
127. Nielsen TO, Leung SCY, Rimm DL, Dodson A, Acs B, Badve S, Denkert C, Ellis MJ, Fineberg S, Flowers M, Kreipe HH, Laenkholm AV, Pan H, Penault-Llorca FM, Polley MY, Salgado R, Smith IE, Sugie T, Bartlett JMS, McShane LM, Dowsett M, Hayes DF. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *J Natl Cancer Inst*. 2021 Jul 1;113(7):808-819. doi: 10.1093/jnci/djaa201.
128. Elkablawy MA, Albasri AM, Mohammed RA, Hussainy AS, Nouh MM, Alhujaily AS. Ki67 expression in breast cancer. Correlation with prognostic markers and clinicopathological parameters in Saudi patients. *Saudi Med J*. 2016 Feb;37(2):137-41. doi: 10.15537/smj.2016.2.12285.
129. Shousha S. Breast pathology: problematic issues. 1st. Shousha S, Ed. Cham (Switzerland): Springer International Publishing; 2017. p. 204–208. DOI:[10.1007/978-3-319-28655-6](https://doi.org/10.1007/978-3-319-28655-6)
130. Волос ЛІ, Дудаш АП. Ki-67 як прогностичний маркер відповідно до молекулярного підтипу раку грудної залози. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки та практики»; м. Одеса, 15-16 травня 2020 р.- Одеса: ГО «Південна фундація медицини», 2020. с.41-47.
131. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, Ortmann O. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer

- patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jun;139(2):539-52. doi: 10.1007/s10549-013-2560-8.
132. Healey MA, Hirko KA, Beck AH, Collins LC, Schnitt SJ, Eliassen AH, Holmes MD, Tamimi RM, Hazra A. Assessment of Ki67 expression for breast cancer subtype classification and prognosis in the Nurses' Health Study. *Breast Cancer Res Treat.* 2017 Nov;166(2):613-622. doi: 10.1007/s10549-017-4421-3.
133. Penault-Llorca F, André F, Sagan C, Lacroix-Triki M, Denoux Y, Verrièle V, Jacquemier J, Baranzelli MC, Bibeau F, Antoine M, Lagarde N, Martin AL, Asselain B, Roché H. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jun 10;27(17):2809-15. doi: 10.1200/JCO.2008.18.2808.
134. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast.* 2008 Aug;17(4):323-34. doi: 10.1016/j.breast.2008.02.002.
135. Tashima R, Nishimura R, Osako T, Nishiyama Y, Okumura Y, Nakano M, Fujisue M, Toyozumi Y, Arima N. Evaluation of an Optimal Cut-Off Point for the Ki-67 Index as a Prognostic Factor in Primary Breast Cancer: A Retrospective Study. *PLoS One.* 2015 Jul 15;10(7):e0119565. doi: 10.1371/journal.pone.0119565.
136. Kim KI, Lee KH, Kim TR, Chun YS, Lee TH, Park HK. Ki-67 as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. *J Breast Cancer.* 2014; 17:40–6. doi:10.4048/jbc.2014.17.1.40.
137. Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, Wienert S, Loibl S, Klauschen F. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. *Breast.* 2015; 24: S67–S72. doi:10.1016/j.breast.2015.07.017
138. Hashmi AA, Hashmi KA, Irfan M, Khan SM, Edhi MM, Ali JP, Hashmi SK, Asif H, Faridi N, Khan A. Ki67 index in intrinsic breast cancer subtypes and its association with prognostic parameters. *BMC Res Notes.* 2019 Sep 23;12(1):605. doi: 10.1186/s13104-019-4653-x.

139. Visscher DW, Pankratz VS, Santisteban M, Reynolds C, Ristimäki A, Vierkant RA. Association Between Cyclooxygenase-2 Expression in Atypical Hyperplasia and Risk of Breast Cancer. *JNCI: J National Cancer Ins.* 2008;100(6):421–7. doi: [10.1093/jnci/djn036](https://doi.org/10.1093/jnci/djn036)
140. Yang WT, Lewis MT, Hess K, Wong H, Tsimelzon A, Karadag N, Cairo M, Wei C, Meric-Bernstam F, Brown P, Arun B, Hortobagyi GN, Sahin A, Chang JC. Decreased TGFbeta signaling and increased COX2 expression in high risk women with increased mammographic breast density. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jan;119(2):305-14. doi: [10.1007/s10549-009-0350-0](https://doi.org/10.1007/s10549-009-0350-0).
141. Davies G, Martin LA, Sacks N, Dowsett M. Cyclooxygenase-2 (COX-2), aromatase and breast cancer: a possible role for COX-2 inhibitors in breast cancer chemoprevention. *Ann Oncol.* 2002 May;13(5):669-78. doi: [10.1093/annonc/mdf125](https://doi.org/10.1093/annonc/mdf125).
142. Larkins TL, Nowell M, Singh S, Sanford GL. Inhibition of cyclooxygenase-2 decreases breast cancer cell motility, invasion and matrix metalloproteinase expression. *BMC Cancer.* 2006 Jul 10;6:181. doi: [10.1186/1471-2407-6-181](https://doi.org/10.1186/1471-2407-6-181).
143. Krcova Z, Ehrmann J, Krejci V, Eliopoulos A, Kolar Z. Tpl-2/Cot, and COX-2 in breast cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2008 Jun;152(1):21-5. doi: [10.5507/bp.2008.003](https://doi.org/10.5507/bp.2008.003)
144. van Nes JG, de Kruijf EM, Faratian D, van de Velde CJ, Putter H, Falconer C, Smit VT, Kay C, van de Vijver MJ, Kuppen PJ, Bartlett JM. COX2 expression in prognosis and in prediction to endocrine therapy in early breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Feb;125(3):671-85. doi: [10.1007/s10549-010-0854-7](https://doi.org/10.1007/s10549-010-0854-7).
145. Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA, Cotsonis G, Cohen C. COX-2 expression in invasive breast cancer: correlation with prognostic parameters and outcome. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2007 Sep;15(3):255-9. doi: [10.1097/01.pai.0000213130.63417.b3](https://doi.org/10.1097/01.pai.0000213130.63417.b3).

146. Guo GL, Yang GL, Li ZY, You J, Yang K, Huang DP, Hu XQ, Zhang XH. [The effect of cyclooxygenase-2 on lymphangiogenesis in breast cancer]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2008 Jan 15;46(2):132-5. Chinese. PMID: 18509974.
147. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, Joensuu H, Isola J. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2002 Feb 1;62(3):632-5. PMID: 11830510.
148. Park BW, Park S, Park HS, Koo JS, Yang WI, Lee JS, Hwang H, Kim SI, Lee KS. Cyclooxygenase-2 expression in proliferative Ki-67-positive breast cancers is associated with poor outcomes. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jun;133(2):741-51. doi: 10.1007/s10549-012-1971-2.
149. Richardsen E, Uglehus RD, Johnsen SH, Busund LT. Immunohistochemical expression of epithelial and stromal immunomodulatory signalling molecules is a prognostic indicator in breast cancer. *BMC Res Notes*. 2012 Feb 21;5:110. doi: 10.1186/1756-0500-5-110.
150. Hou Z, Falcone DJ, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. Macrophages induce COX-2 expression in breast cancer cells: role of IL-1 β autoamplification. *Carcinogenesis*. 2011 May;32(5):695-702. doi: 10.1093/carcin/bgr027.
151. Troester MA, Lee MH, Carter M, Fan C, Cowan DW, Perez ER, Pirone JR, Perou CM, Jerry DJ, Schneider SS. Activation of host wound responses in breast cancer microenvironment. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 15;15(22):7020-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1126.
152. Hu M, Peluffo G, Chen H, Gelman R, Schnitt S, Polyak K. Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3372-7. doi: 10.1073/pnas.0813306106.
153. Присташ Ю. Я., Фецич Т. Г. Дослідження СОХ-2 як прогностичного фактора виникнення локального рецидиву раку молочної залози. *Вісник наукових досліджень*. 2016; № 1: 50–3. Available at: <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/visnyk-nauk-dos/article/view/6119>

154. Hu M, Peluffo G, Chen H, Gelman R, Schnitt S, Polyak K. Role of COX-2 in epithelial-stromal cell interactions and progression of ductal carcinoma in situ of the breast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3372-7. doi: 10.1073/pnas.0813306106
155. Zhang XH, Huang DP, Guo GL, Chen GR, Zhang HX, Wan L, Chen SY. Coexpression of VEGF-C and COX-2 and its association with lymphangiogenesis in human breast cancer. *BMC Cancer*. 2008 Jan 13;8:4. doi: 10.1186/1471-2407-8-4.
156. Kulkarni S, Patil DB, Diaz LK, Wiley EL, Morrow M, Khan SA. COX-2 and PPARgamma expression are potential markers of recurrence risk in mammary duct carcinoma in-situ. *BMC Cancer*. 2008; 8:36. doi: 10.1186/1471-2407-8-36
157. Jana D, Sarkar DK, Ganguly S, Saha S, Sa G, Manna AK, Banerjee A, Mandal S. Role of Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Prognosis of Breast Cancer. *Indian J Surg Oncol*. 2014 Mar;5(1):59-65. doi: 10.1007/s13193-014-0290-y.
158. Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991 Apr;113(1):173-85. doi: 10.1083/jcb.113.1.173.
159. Baranwal S, Alahari SK. Molecular mechanisms controlling E-cadherin expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jun 19;384(1):6-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.04.051.
160. Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 2005 Aug;5(8):591-602. doi: 10.1038/nrc1670.
161. Andrews JL, Kim AC, Hens JR. The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast Cancer Res*. 2012 Feb 8;14(1):203. doi: 10.1186/bcr3065.
162. Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*. 2008 Nov 24;27(55):6920-9. doi: 10.1038/onc.2008.343.

163. Kaszak I, Witkowska-Piłaszewicz O, Niewiadomska Z, Dworecka-Kaszak B, Ngosa Toka F, Jurka P. Role of Cadherins in Cancer-A Review. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 15;21(20):7624. doi: 10.3390/ijms21207624.
164. Faria G, Cardoso MJ, Martins D, Bettencourt H, Amendoeira I, Schimitt F. P-cadherin as prognostic factor for loco-regional relapse in breast cancer. *Acta Med Port*. 2012 Mar-Apr;25(2):97-105. PMID: 22985920.
165. Makrilia N, Kollias A, Manolopoulos L, Syrigos K. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer. *Cancer Invest*. 2009 Dec;27(10):1023-37. doi: 10.3109/07357900902769749.
166. Paredes J, Figueiredo J, Albergaria A, Oliveira P, Carvalho J. et al. Epithelial E- and P-cadherins: role and clinical significance in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1826(2):297-311. doi: 10.1016/j.bbcan.2012.05.002.
167. Sethi S, Sarkar FH, Ahmed Q, Bandyopadhyay S, Nahleh ZA, Semaan A, Sakr W, Munkarah A, Ali-Fehmi R. Molecular markers of epithelial-to-mesenchymal transition are associated with tumor aggressiveness in breast carcinoma. *Transl Oncol*. 2011 Aug;4(4):222-6. doi: 10.1593/tlo.10244.
168. Fulga V, Rudico L, Balica AR, Cimpean AM, Saptefrati L, Margan MM, Raica M. Differential expression of e-cadherin in primary breast cancer and corresponding lymph node metastases. *Anticancer Res*. 2015 Feb;35(2):759-65. PMID: 25667455.
169. Saadatmand S, de Kruijf EM, Sajet A, Dekker-Ensink NG, van Nes JG, Putter H, Smit VT, van de Velde CJ, Liefers GJ, Kuppen PJ. Expression of cell adhesion molecules and prognosis in breast cancer. *Br J Surg*. 2013 Jan;100(2):252-60. doi: 10.1002/bjs.8980.
170. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*. 2009 Jun;119(6):1429-37. doi: 10.1172/JCI36183.
171. Wells A, Chao YL, Grahovac J, Wu Q, Lauffenburger DA. Epithelial and mesenchymal phenotypic switchings modulate cell motility in metastasis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011; 16:815-37. doi: [10.2741/3722](https://doi.org/10.2741/3722)

172. Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res.* 2003;5(6):R217-22. doi: 10.1186/bcr651.
173. Albergaria A, Ribeiro AS, Vieira AF, Sousa B, Nobre AR, Seruca R, Schmitt F, Paredes J. P-cadherin role in normal breast development and cancer. *Int J Dev Biol.* 2011;55(7-9):811-22. doi: 10.1387/ijdb.113382aa.
174. Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Albergaria A, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin expression in breast cancer: a review. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):214. doi: 10.1186/bcr1774.
175. Rezaei M, Friedrich K, Wielockx B, Kuzmanov A, Kettelhake A, Labelle M, Schnittler H, Baretton G, Breier G. Interplay between neural-cadherin and vascular endothelial-cadherin in breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 2012 Dec 6;14(6):R154. doi: 10.1186/bcr3367.
176. Folkman J. The vascularization of tumors. *Sci Am.* 1976 May;234(5):58-64, 70-3. doi: 10.1038/scientificamerican0576-58.
177. Shen Y, Quan J, Wang M, Li S, Yang J, Lv M, Chen Z, Zhang L, Zhao X, Yang J. Tumor vasculogenic mimicry formation as an unfavorable prognostic indicator in patients with breast cancer. *Oncotarget.* 2017 Apr 7;8(34):56408-56416. doi: 10.18632/oncotarget.16919.
178. Liu T, Sun B, Zhao X, Li Y, Gu Q, Dong X, Liu F. OCT4 expression and vasculogenic mimicry formation positively correlate with poor prognosis in human breast cancer. *Int J Mol Sci.* 2014 Oct 28;15(11):19634-49. doi: 10.3390/ijms151119634.
179. Şener E, Şipal S, Gündoğdu C. Comparison of Microvessel Density with Prognostic Factors in Invasive Ductal Carcinomas of the Breast. *Turk Patoloji Derg.* 2016;32(3):164-70. English. doi: 10.5146/tjpath.2016.01366.
180. Kraby MR, Opdahl S, Akslen LA, Bofin AM. Quantifying tumour vascularity in non-luminal breast cancers. *J Clin Pathol.* 2017 Sep;70(9):766-74. doi: 10.1136/jclinpath-2016-204208.

181. Fukumura D, Duda DG, Munn LL, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. *Microcirculation*. 2010 Apr;17(3):206-25. doi: 10.1111/j.1549-8719.2010.00029.x.
182. Hlushchuk R, Barré S, Djonov V. Morphological Aspects of Tumor Angiogenesis. *Methods Mol Biol*. 2016;1464:13-24. doi: 10.1007/978-1-4939-3999-2_2.
183. Chappell JC, Cluceru JG, Nesmith JE, Mouillesseaux KP, Bradley VB, Hartland CM, Hashambhoy-Ramsay YL, Walpole J, Peirce SM, Mac Gabhann F, Bautch VL. Flt-1 (VEGFR-1) coordinates discrete stages of blood vessel formation. *Cardiovasc Res*. 2016 Jul 1;111(1):84-93. doi: 10.1093/cvr/cvw091.
184. Qian CN, Tan MH, Yang JP, Cao Y. Revisiting tumor angiogenesis: vessel co-option, vessel remodeling, and cancer cell-derived vasculature formation. *Chin J Cancer*. 2016 Jan 8; 35:10. doi: 10.1186/s40880-015-0070-2.
185. Naghavi N, Hosseini FS, Sardarabadi M, Kalani H. Simulation of tumor induced angiogenesis using an analytical adaptive modeling including dynamic sprouting and blood flow modeling. *Microvasc Res*. 2016 Sep;107:51-64. doi: 10.1016/j.mvr.2016.05.002.
186. Hosseini F, Naghavi N. Modelling Tumor-induced Angiogenesis: Combination of Stochastic Sprout Spacing and Sprout Progression. *J Biomed Phys Eng*. 2017 Sep 1;7(3):233-56. PMID: 29082215.
187. Qin L, Bromberg-White JL, Qian CN. Opportunities and challenges in tumor angiogenesis research: back and forth between bench and bed. *Adv Cancer Res*. 2012;113:191-239. doi: 10.1016/B978-0-12-394280-7.00006-3.
188. Cai Y, Wu J, Li Z. A Coupled Mathematical Model of Cell Migration, Vessel Cooption and Tumour Microenvironment during the Initiation of Micrometastases. *Mol Cell Biomech*. 2015;12(4):231-48. PMID: 27263259.
189. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*. 2008 Aug;8(8):592-603. doi: 10.1038/nrc2442.

190. Franco M, Pàez-Ribes M, Cortez E, Casanovas O, Pietras K. Use of a mouse model of pancreatic neuroendocrine tumors to find pericyte biomarkers of resistance to anti-angiogenic therapy. *Horm Metab Res.* 2011 Nov;43(12):884-9. doi: 10.1055/s-0031-1284381.
191. Seftor RE, Hess AR, Seftor EA, Kirschmann DA, Hardy KM, Margaryan NV, Hendrix MJ. Tumor cell vasculogenic mimicry: from controversy to therapeutic promise. *Am J Pathol.* 2012 Oct;181(4):1115-25. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.07.013.
192. Qiao L, Liang N, Zhang J, Xie J, Liu F, Xu D, Yu X, Tian Y. Advanced research on vasculogenic mimicry in cancer. *J Cell Mol Med.* 2015 Feb;19(2):315-26. doi: 10.1111/jcmm.12496.
193. Yang Z, Sun B, Li Y, Zhao X, Zhao X, Gu Q, An J, Dong X, Liu F, Wang Y. ZEB2 promotes vasculogenic mimicry by TGF- β 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2015 Jun;98(3):352-9. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.03.030.
194. Langer EM, Kendsersky ND, Daniel CJ, Kuziel GM, Pelz C, Murphy KM, Capecchi MR, Sears RC. ZEB1-repressed microRNAs inhibit autocrine signaling that promotes vascular mimicry of breast cancer cells. *Oncogene.* 2018 Feb 22;37(8):1005-1019. doi: 10.1038/onc.2017.356.
195. Angara K, Borin TF, Arbab AS. Vascular Mimicry: A Novel Neovascularization Mechanism Driving Anti-Angiogenic Therapy (AAT) Resistance in Glioblastoma. *Transl Oncol.* 2017 Aug;10(4):650-60. doi: 10.1016/j.tranon.2017.04.007.
196. Mehran R, Nilsson M, Khajavi M, Du Z, Cascone T, Wu HK, Cortes A, Xu L, Zurita A, Schier R, Riedel B, El-Zein R, Heymach JV. Tumor endothelial markers define novel subsets of cancer-specific circulating endothelial cells associated with antitumor efficacy. *Cancer Res.* 2014 May 15;74(10):2731-41. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2044.
197. Cattin S, Fellay B, Pradervand S, Trojan A, Ruhstaller T, Rüegg C, Fürstenberger G. Bevacizumab specifically decreases elevated levels of

- circulating KIT+CD11b+ cells and IL-10 in metastatic breast cancer patients. *Oncotarget*. 2016 Mar 8;7(10):11137-50. doi: 10.18632/oncotarget.7097.
198. Zhao X, Wen X, Wei W, Su Y, You J, Gong L, Zhang Z, Wang M, Xiao J, Wei X, Wang C. Predictors for the efficacy of Endostar combined with neoadjuvant chemotherapy for stage IIIA (N2) NSCLC. *Cancer Biomark*. 2017 Dec 12;21(1):169-177. doi: 10.3233/CBM-170565.
199. Kuo YH, Lin CH, Shau WY, Chen TJ, Yang SH, Huang SM, Hsu C, Lu YS, Cheng AL. Dynamics of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells in breast cancer patients receiving cytotoxic chemotherapy. *BMC Cancer*. 2012 Dec 26;12:620. doi: 10.1186/1471-2407-12-620.
200. Arnes JB, Stefansson IM, Straume O, Baak JP, Lønning PE, Foulkes WD, Akslen LA. Vascular proliferation is a prognostic factor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jun;133(2):501-10. doi: 10.1007/s10549-011-1785-7.
201. Haisan A, Rogojanu R, Croitoru C, Jitaru D, Tarniceriu C, Danciu M, Carasevici E. Digital microscopy assessment of angiogenesis in different breast cancer compartments. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:286902. doi: 10.1155/2013/286902.
202. Ribatti D, Nico B, Ruggieri S, Tamma R, Simone G, Mangia A. Angiogenesis and Antiangiogenesis in Triple-Negative Breast cancer. *Transl Oncol*. 2016 Oct;9(5):453-57. doi: 10.1016/j.tranon.2016.07.002.
203. Smith NR, Baker D, Farren M, Pommier A, Swann R, Wang X, Mistry S, McDaid K, Kendrew J, Womack C, Wedge SR, Barry ST. Tumor stromal architecture can define the intrinsic tumor response to VEGF-targeted therapy. *Clin Cancer Res*. 2013;19(24):6943-56. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1637.
204. Sa-Nguanraksa D, O-Charoenrat P. The role of vascular endothelial growth factor a polymorphisms in breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2012 Nov 13;13(11):14845-64. doi: 10.3390/ijms131114845.
205. Shahneh FZ, Baradaran B, Zamani F, Aghebati-Maleki L. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapies. *Hum Antibodies*. 2013;22(1-2):15-9. doi: 10.3233/HAB-130267.

206. Lebok P, Huber J, Burandt EC, Lebeau A, Marx AH, Terracciano L, Heilenkötter U, Jänicke F, Müller V, Paluchowski P, Geist S, Wilke C, Simon R, Sauter G, Quaas A. Loss of membranous VEGFR1 expression is associated with an adverse phenotype and shortened survival in breast cancer. *Mol Med Rep.* 2016 Aug;14(2):1443-50. doi: 10.3892/mmr.2016.5430.
207. Shrivastav S, Bal A, Singh G, Joshi K. Tumor Angiogenesis in Breast Cancer: Pericytes and Maturation Does Not Correlate With Lymph Node Metastasis and Molecular Subtypes. *Clin Breast Cancer.* 2016 Apr;16(2):131-8. doi: 10.1016/j.clbc.2015.09.002.
208. Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol.* 1990 Sep;43(9):752-7. doi: 10.1136/jcp.43.9.752.
209. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al-Nakib L. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Mar 2;86(5):386-8. doi: 10.1093/jnci/86.5.386.
210. Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet.* 1992 Nov 7;340(8828):1120-4. doi: 10.1016/0140-6736(92)93150-1.
211. Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, Jones M, Gatter KC, Mason DY. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J Clin Pathol.* 1992 Feb;45(2):143-8. doi: 10.1136/jcp.45.2.143.
212. Fox SB, Leek RD, Weekes MP, Whitehouse RM, Gatter KC, Harris AL. Quantitation and prognostic value of breast cancer angiogenesis: comparison of microvessel density, Chalkley count, and computer image analysis. *J Pathol.* 1995 Nov;177(3):275-83. doi: 10.1002/path.1711770310.

213. Leek RD. The prognostic role of angiogenesis in breast cancer. *Anticancer Res.* 2001 Nov-Dec;21(6B):4325-31. PMID: 11908687.
214. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):669-76. doi: 10.1038/nm0603-669.
215. Duda DG, Batchelor TT, Willett CG, Jain RK. VEGF-targeted cancer therapy strategies: current progress, hurdles and future prospects. *Trends Mol Med.* 2007 Jun;13(6):223-30. doi: 10.1016/j.molmed.2007.04.001.
216. Bachelier R, Gonin V, Goehrig D, Deux B, Clézardin P. Targeting VEGF, and its receptors in the treatment of breast cancer bone metastases. *Cancer Treatment Reviews.* 2008; 34 (Suppl.1), 41: P56. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2008.03.116>
217. Fertig EJ, Lee E, Pandey NB, Popel AS. Analysis of gene expression of secreted factors associated with breast cancer metastases in breast cancer subtypes. *Sci Rep.* 2015 Jul 15; 5:12133. doi: 10.1038/srep12133.
218. Mittal K, Ebos J, Rini B. Angiogenesis, and the tumor microenvironment: vascular endothelial growth factor and beyond. *Semin Oncol.* 2014 Apr; 41(2):235-51. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.02.007.
219. Drevs J. VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy. *European Journal of Cancer Supplements.* 2008; 6 (6): 7-13. [https://doi.org/10.1016/S1359-6349\(08\)70287-8](https://doi.org/10.1016/S1359-6349(08)70287-8)
220. Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer.* 2020 May 18;11(15):4474-4494. doi: 10.7150/jca.44313.
221. Varella L, Abraham J, Kruse M. Revisiting the Role of Bevacizumab in the Treatment of Breast Cancer. *Semin Oncol.* 2017 Aug;44(4):273-285. doi: 10.1053/j.seminoncol.2017.10.010.
222. Qian YR, Guo Y, Wan HY, Fan L, Feng Y, Ni L, Xiang Y, Li QY. Angiotensin-converting enzyme 2 attenuates the metastasis of non-small cell lung cancer through inhibition of epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Rep.* 2013 Jun;29(6):2408-14. doi: 10.3892/or.2013.2370.

223. Fantozzi A, Gruber DC, Pisarsky L, Heck C, Kunita A, Yilmaz M, Meyer-Schaller N, Cornille K, Hopfer U, Bentires-Alj M, Christofori G. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res.* 2014 Mar 1;74(5):1566-75. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1641.
224. Oh E, Kim JY, Cho Y, An H, Lee N, Jo H, Ban C, Seo JH. Overexpression of angiotensin II type 1 receptor in breast cancer cells induces epithelial-mesenchymal transition and promotes tumor growth and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jun;1863(6 Pt A):1071-81. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.03.010.
225. Ribatti D. Epithelial-mesenchymal transition in morphogenesis, cancer progression and angiogenesis. *Exp Cell Res.* 2017 Apr 1;353(1):1-5. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.02.041.
226. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. 1991; 19(5): 403–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
227. Allison KH, Hammond MEH, Dowsett M, McKernin SE, Carey LA, Fitzgibbons PL, et al. Estrogen and Progesterone Receptor Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2020 May;144(5):545-563. doi: 10.5858/arpa.2019-0904-SA
228. Qureshi HS, Linden MD, Divine G and Raju UB: E-Cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol.* 2006; 125(3): 377-85. PMID: 16613340
229. Bosari S, Lee AK, DeLellis RA, Wiley BD, Heatley GJ, Silverman ML. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. *Hum Pathol.* 1992 Jul;23(7):755-61. doi: 10.1016/0046-8177(92)90344-3.
230. Volos LI, Dudash AP. Clinical and morphological features of luminal “A” subtype of invasive ductal breast cancer. *Periodyk Naukowy Akademii*

- Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland). 2020; 43(6): 293-306.
DOI: <https://doi.org/10.23856/4338>
231. Volos LI, Dudash AP. Invasive ductal breast carcinoma: morphological features of molecular subtypes. The modern stage of the development of medical education in Ukraine and EU countries: Collective monograph Medical University of Lublin; Riga, Latvia: “Baltija Publishing”, 2021. P.50-66. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-090-2-3>
232. Волос Л.І., Дацюк Ю.Р., Дудаш А.П. Скануюча електронна мікроскопія інвазивного протокового раку грудної залози/ Scanning electron microscopy of invasive ductal breast cancer. Lviv Medical Journal /Acta Medica Leopoliensia. 2021; 27(3–4): 9-25. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.009>
233. Tuk B, Corrales D. Scanning electron microscopy in gastric adenocarcinoma and intestinal metaplasia. Rev Biol Trop. 1986; 34(2): 167–70. PMID: 3423334
234. Ishiwata T, Hasegawa F, Michishita M, Sasaki N, Ishikawa N, Takubo K, Matsuda Y, Arai T, Aida J. Electron microscopic analysis of different cell types in human pancreatic cancer spheres. Oncol Lett. 2018 Feb;15(2):2485-2490. doi: 10.3892/ol.2017.7554.
235. Wang NS. The surface appearance of some lung tumors, mesothelioma and their precursor lesions. Scan Electron Microsc. 1980;(3):79-88. PMID: 6251540.
236. Gao Z, Liu R, Ye N, Liu C, Li X, Guo X, Zhang Z, Li X, Yao Y, Jiang X. FOXO1 Inhibits Tumor Cell Migration via Regulating Cell Surface Morphology in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. Cell Physiol Biochem. 2018;48(1):138-148. doi: 10.1159/000491670.
237. Trump BF, Heatfield BM, Phelps PC, Sanefuji H, Shamsuddin AK. Cell surface changes in preneoplastic and neoplastic epithelium. Scan Electron Microsc. 1980;(3):43-60. PMID: 6997985.
238. Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. Br J Cancer. 1957 Sep;11(3):359-77. doi: 10.1038/bjc.1957.43.

239. Hartveit F. Prognostic typing in breast cancer. *Br Med J*. 1971 Oct 30;4(5782):253-7. doi: 10.1136/bmj.4.5782.253.
240. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10. doi: 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x.
241. Zgura A, Galesa L, Bratila E, Anghel R. Relationship between Tumor Infiltrating Lymphocytes and Progression in Breast Cancer. *Maedica (Bucur)*. 2018 Dec;13(4):317-320. Greek, Modern. doi: 10.26574/maedica.2018.13.4.317.
242. Locy H, Verhulst S, Cools W, Waelput W, Brock S, Cras L, Schiettecatte A, Jonckheere J, van Grunsven LA, Vanhoeij M, Thielemans K, Breckpot K. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: A Proposal for Combining Immunohistochemistry and Gene Expression Analysis to Refine Scoring. *Front Immunol*. 2022 Feb 11;13:794175. doi: 10.3389/fimmu.2022.794175.
243. El Bairi K, Haynes HR, Blackley E, et al. International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. The tale of TILs in breast cancer: A report from The International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. *NPJ Breast Cancer*. 2021 Dec 1;7(1):150. doi: 10.1038/s41523-021-00346-1.
244. Lundgren C, Bendahl PO, Ekholm M, Fernö M, Forsare C, Krüger U, Nordenskjöld B, Stål O, Rydén L. Tumour-infiltrating lymphocytes as a prognostic and tamoxifen predictive marker in premenopausal breast cancer: data from a randomised trial with long-term follow-up. *Breast Cancer Res*. 2020 Dec 23;22(1):140. doi: 10.1186/s13058-020-01364-w.
245. Valenza C, Taurelli Salimbeni B, Santoro C, Trapani D, Antonarelli G, Curigliano G. Tumor Infiltrating Lymphocytes across Breast Cancer Subtypes: Current Issues for Biomarker Assessment. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 26;15(3):767. doi: 10.3390/cancers15030767.

246. Yang L, Wang XW, Zhu LP, Wang HL, Wang B, Zhao Q, Wang XY. Significance and prognosis of epithelial-cadherin expression in invasive breast carcinoma. *Oncol Lett*. 2018 Aug;16(2):1659-65. doi: 10.3892/ol.2018.8836.
247. Corso G, Figueiredo J, De Angelis SP, Corso F, Girardi A, Pereira J, Seruca R, Bonanni B, Carneiro P, Pravettoni G, Guerini Rocco E, Veronesi P, Montagna G, Sacchini V, Gandini S. E-cadherin deregulation in breast cancer. *J Cell Mol Med*. 2020 Jun;24(11):5930-6. doi: 10.1111/jcmm.15140.
248. Na TY, Schecterson L, Mendonsa AM, Gumbiner BM. The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Mar 17;117(11):5931-7. doi: 10.1073/pnas.1918167117.
249. Harris RE, Casto BC, Harris ZM. Cyclooxygenase-2 and the inflammogenesis of breast cancer. *World J Clin Oncol*. 2014 Oct 10;5(4):677-92. doi: 10.5306/wjco.v5.i4.677.
250. Jana D, Sarkar DK, Ganguly S, Saha S, Sa G, Manna AK, Banerjee A, Mandal S. Role of Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Prognosis of Breast Cancer. *Indian J Surg Oncol*. 2014 Mar;5(1):59-65. doi: 10.1007/s13193-014-0290-y.
251. Madu CO, Wang S, Madu CO, Lu Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J Cancer*. 2020 May 18;11(15):4474-94. doi: 10.7150/jca.44313.
252. Harry JA, Ormiston ML. Novel Pathways for Targeting Tumor Angiogenesis in Metastatic Breast Cancer. *Front Oncol*. 2021 Dec 3;11:772305. doi: 10.3389/fonc.2021.772305.
253. Волос ЛІ, Дудаш АП. Особливості лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози. *Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu)*. 2021; Том 6, № 6 (34): 44-56. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.06.044>
254. Волос ЛІ, Дудаш АП. Особливості експресії COX-2 в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. *Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu)*. 2022; Том 7, № 1 (35): 68-78. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.01.068>

255. Volos LI, Dudash AP. Tumor-infiltrating lymphocytes in nonluminal invasive ductal breast carcinoma. *Azerbaijan Medical Journal* (Scopus: Q4). 2022; 1: 131–137. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.021>
256. Volos LI, Dudash AP. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer. *Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland)*. 2022; 50(1): 269-280. DOI: <https://doi.org/10.23856/5032>
257. Волос ЛІ, Дудаш АП. Особливості експресії молекул клітинної адгезії E-кадгерину в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. *Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. bìol. Sportu)*. 2022; Том 7, № 3 (37): 52-64. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.03.052>
258. Volos LI, Dudash AP. Features of E-cadherin expression in the triple negative and luminal “A” phenotypes invasive ductal breast cancer. *Azerbaijan Medical Journal* (Scopus: Q4). 2022; 3: 125–132. <https://doi.org/10.34921/amj.2022.3.020>
259. Volos L, Dudash A. The role of overexpression of Cyclooxygenase-2 in the prognosis of invasive ductal breast cancer. International scientific conference "Medicine and health care in modern society: actual problems and modern aspects" February 26-27, 2021. Lublin, Poland: Izdevnieciba “Baltija Publishing”, 2021; 49-52.
260. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. Lymphoid environment in Luminal A subtype invasive ductal breast carcinoma. (17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide, 17–21 March 2021). *The Breast* (Scopus, Web of Science, Q1). 2021; Vol. 56 (1S): S27. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(21\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(21)00112-0)
261. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. E-cadherin expression in triple-negative invasive ductal breast carcinoma. (17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide, 17–21 March 2021). *The Breast* (Scopus,

- Web of Science, Q1). 2021; Vol. 56 (1S): S27-28. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(21\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(21)00113-2)
262. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. Lymphoid Environment in Triple-Negative Invasive Ductal Breast Carcinoma. International scientific and practical conference "Scientific progress of medicine and pharmacy of the EU countries", April 23-24, 2021. Częstochowa, Poland: "Baltija Publishing", 2021; 26-30.
263. Volos L, Dudash A. Cox-2 overexpression in triple-negative invasive ductal breast cancer with correlation to clinicopathological parameters and neoangiogenesis (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). *The Breast* (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S35-36. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledition.com>
264. Volos L, Dudash A. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer and relationship with clinicopathological factors (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). *The Breast* (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S36-37. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledition.com>
265. Remmele W, Stegner HE. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987 May;8(3):138-40. German. PMID: 3303008.
266. Yeh I, Brooks JSJ, Pietra GG. *Atlas of Microscopic Artifacts and Foreign Materials*. 1997. 1st ed. Baltimore: Williams & Wilkins;144.
267. Acs G, Paragh G, Chuang ST, Laronga C, Zhang PJ. The presence of micropapillary features and retraction artifact in core needle biopsy material predicts lymph node metastasis in breast carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2009 Feb;33(2):202-10. doi: 10.1097/PAS.0b013e318185e171.
268. Irie J, Manucha V, Ioffe OB, Silverberg SG. Artefact as the pathologist's friend: peritumoral retraction in in situ and infiltrating duct carcinoma of the breast. *Int J Surg Pathol*. 2007 Jan;15(1):53-9. doi: 10.1177/1066896906295690.

269. Chen QY, Jiao DM, Wu YQ, Chen J, Wang J, Tang XL, Mou H, Hu HZ, Song J, Yan J, Wu LJ, Chen J, Wang Z. MiR-206 inhibits HGF-induced epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in non-small cell lung cancer via c-Met /PI3k/Akt/mTOR pathway. *Oncotarget*. 2016 Apr 5;7(14):18247-61. doi: 10.18632/oncotarget.7570.
270. Norita R, Suzuki Y, Furutani Y, Takahashi K, Yoshimatsu Y, Podyma-Inoue KA, Watabe T, Sato Y. Vasohibin-2 is required for epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by modulating transforming growth factor- β signaling. *Cancer Sci*. 2017 Mar;108(3):419-26. doi: 10.1111/cas.13157.
271. Matsumoto H, Koo SL, Dent R, Tan PH, Iqbal J. Role of inflammatory infiltrates in triple negative breast cancer. *J Clin Pathol*. 2015 Jul;68(7):506-10. PMID: 25750267. doi: 10.1136/jclinpath-2015-202944
272. Volos L, Dudash A. Cox-2 overexpression in triple-negative invasive ductal breast cancer with correlation to clinicopathological parameters and neoangiogenesis (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). *The Breast* (Journal Indexing – Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S35-36. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledition.com>
273. Volos L., Dudash A. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer and relationship with clinicopathological factors (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). *The Breast* (Journal Indexing – Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S36-37. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledition.com>
274. Волос ЛІ, Дудаш АП. Прогнозування значення показників CD3 лімфоцитів на інвазивному краї в потрійному негативному підтипі інфільтративного протокового раку грудної залози. *Proceedings of the 7th International scientific and practical conference, March 29–31, 2023. BoScience Publisher. Boston, USA, 2023; 87-92.*

ДОДАТКИ

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Volos LI, Dudash AP. Clinical and morphological features of luminal “A” subtype of invasive ductal breast cancer. *Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland)*. 2020; 43(6): 293-306. DOI: <https://doi.org/10.23856/4338> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати клініко-морфологічних особливостей люмінального А підтипу інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
2. Volos LI, Dudash AP. Invasive ductal breast carcinoma: morphological features of molecular subtypes. The modern stage of the development of medical education in Ukraine and EU countries: Collective monograph Medical University of Lublin; Riga, Latvia: “Baltija Publishing”, 2021. P.50-66. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-090-2-3> (Особистий внесок – провів аналіз патоморфологічних особливостей різних молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
3. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози. *Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu)*. 2021; Том 6, № 6 (34): 44-56. <https://doi.org/10.26693/jmbs06.06.044> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати дослідження лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
4. Волос Л.І., Дацюк Ю.Р., Дудаш А.П. Скануюча електронна мікроскопія інвазивного протокового раку грудної залози/ Scanning electron microscopy

of invasive ductal breast cancer. *Lviv Medical Journal /Acta Medica Leopoliensia*. 2021; Vol. 27 No. 3–4: 9-25. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.009> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати електронно-мікроскопічного та гістологічного дослідження інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).

5. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості експресії COX-2 в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. *Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu)*. 2022; Том 7, № 1 (35): 68-78. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.01.068> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати імуногістохімічного дослідження експресії циклооксигенази-2 в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
6. Volos LI, Dudash AP. Tumor-infiltrating lymphocytes in nonluminal invasive ductal breast carcinoma. *Azerbaijan Medical Journal (Scopus: Q4)*. 2022; 1: 131–137. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.021> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати імуногістохімічного та гістологічного дослідження пухлино-інфільтруючих лімфоцитів в нелюмінальних фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
7. Volos LI, Dudash AP. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer. *Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland)*. 2022; 50(1): 269-280. DOI: <https://doi.org/10.23856/5032> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати гістологічного та імуногістохімічного дослідження пухлинного ангіогенезу в інвазивному протоковому раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
8. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості експресії молекул клітинної адгезії E-кадгерину в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку

грудної залози. Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu). 2022; Том 7, № 3 (37): 52-64. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.03.052> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати дослідження експресії E-кадгерину в інвазивному протоковому раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).

9. Volos LI, Dudash AP. Features of E-cadherin expression in the triple negative and luminal “A” phenotypes invasive ductal breast cancer. Azerbaijan Medical Journal (Scopus: Q4). 2022; 3: 125–132. <https://doi.org/10.34921/amj.2022.3.020> (Особистий внесок – провів аналіз та узагальнив результати імуногістохімічного дослідження E-кадгерину в потрійному негативному та люмінальному А фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).

Наукові праці, які засвідчують апробацію результатів дисертації:

10. Dudash A., Saliuk A., Shevchenko S., Khanevska Ya. Prognostic significance of receptor tumor status in invasive ductal carcinoma. 14th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists (May 10-13th, 2018, Warsaw, Poland), Abstract Book, p.165-166. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
11. Дудаш А.П. Патоморфологічна характеристика інвазивного протокового раку грудної залози у жінок з урахуванням імунофенотипу пухлини. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання морфогенезу та ре моделювання тканин і органів у нормі та патології» та секції «Фундаментальні аспекти медицини» XVII Конгресу Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (м. Тернопіль, 20-21 вересня 2018 року).- с.258.

12. Дудаш А.П. Патоморфологічні критерії діагностики інвазивної протокової і внутрішньо-протокової карциноми *in situ* грудної залози. Перспективи розвитку сучасної патології: Матеріали X Конгресу Асоціації патологів України (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 року) / ІФНМУ, Асоц. патологів України. - Івано-Франківськ, 2018. - с.81.
13. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості морфологічної структури різних імуногістохімічних типів протокового раку грудної залози. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 року). - С.30-32. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень морфологічних особливостей інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
14. Волос Л.І., Дудаш А.П. Клініко-морфологічна та імуногістохімічна характеристика тричі-негативного інфільтративного протокового раку грудної залози. Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI ст.: Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції (м. Львів, 25–26 травня 2019 року). – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2019. – с.9-12. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень імуногістохімічних та гістологічних особливостей потрійного негативного фенотипу інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
15. Волос Л.І., Дудаш А.П. Клініко-морфологічні особливості люмінального А типу інфільтруючого протокового раку грудної залози. Здобутки клінічної та експериментальної медицини, присвячена 165-річчю від Дня народження Івана Яковича Горбачевського: Матеріали підсумкової LXII наук.-практ. конф. (Тернопіль, 13 черв. 2019 р.) / Терноп. нац. мед. ун-т імені І. Я. Горбачевського. – Тернопіль: ТНМУ, 2019. С 41-42. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень

гістологічних особливостей люмінального А фенотипу інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).

16. Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості морфологічної будови первинної пухлини інфільтративного протокового раку грудної залози люмінального В типу. Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини» (м. Львів, 21–22 червня 2019 року). – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2019. – с.9-12. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури, проведенні досліджень гістологічних особливостей будови люмінального В фенотипу інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
17. Volos LI, Dudash AP. Molecular type as a prognosis factor of ductal breast cancer metastasis. Innovative development of science and education. Abstracts of the 3rd International scientific and practical conference. ISGT Publishing House. Athens, Greece. 2020. Pp. 59-65. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
18. Волос ЛІ, Дудаш АП. Ki-67 як прогностичний маркер відповідно до молекулярного підтипу раку грудної залози. Матеріали міжнародної науково-практичної конференції «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки та практики»; м. Одеса, 15-16 травня 2020 р.- Одеса: ГО «Південна фундація медицини», 2020. с.41-47. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо прогностичного значення маркера проліферативної активності Ki-67 в інвазивному протоковому раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
19. Волос ЛІ, Дудаш АП. Молекулярна гетерогенність потрійно-негативного раку грудної залози як прогностичний чинник перебігу. Збірник тез наукових робіт учасників міжнародної науково-практичної конференції «Актуальні питання розвитку медичних наук у ХХІ ст.»; Львів, 22–23

- травня 2020 р. – Львів: ГО «Львівська медична спільнота», 2020, с.17-21. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо потрійного негативного раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
20. Волос Л.І., Дудаш А.П. Прогноз перебігу молекулярних типів раку грудної залози. Матеріали XVIII Конгресу Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (СФУЛТ); 1-3 жовтня 2020; Львів 2020, с. 169. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо прогнозу різних фенотипів раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
21. Volos L, Dudash A. The role of overexpression of Cyclooxygenase-2 in the prognosis of invasive ductal breast cancer. International scientific conference "Medicine and health care in modern society: actual problems and modern aspects" February 26-27, 2021. Lublin, Poland: Izdevnieciba "Baltija Publishing", 2021; 49-52. (Особистий внесок – у проведенні пошуку літератури щодо ролі циклооксигенази-2 для прогнозу інвазивного протокового раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
22. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. Lymphoid environment in Luminal A subtype invasive ductal breast carcinoma. (17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide, 17–21 March 2021). The Breast (Scopus, Web of Science, Q1). 2021; Vol. 56 (1S): S27. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(21\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(21)00112-0) (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження лімфоїдного мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози люмінального А підтипу, підготовці тез до друку).
23. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. E-cadherin expression in triple-negative invasive ductal breast carcinoma. (17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide, 17–21 March 2021). The Breast (Scopus, Web of Science, Q1). 2021; Vol. 56 (1S): S27-28. [https://doi.org/10.1016/S0960-9776\(21\)00113-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9776(21)00113-2) (Особистий внесок – в

узагальненні результатів дослідження експресії E-кадгерину в потрійному негативному раку грудної залози, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).

24. Volos L, Dudash A, Guley R, Petronchak O. Lymphoid Environment in Triple-Negative Invasive Ductal Breast Carcinoma. International scientific and practical conference "Scientific progress of medicine and pharmacy of the EU countries", April 23-24, 2021. Częstochowa, Poland: "Baltija Publishing", 2021; 26-30. (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження лімфоїдного мікрооточення в потрійному негативному раку грудної залози, підготовці тез до друку).
25. Volos L., Dudash A. Cox-2 overexpression in triple-negative invasive ductal breast cancer with correlation to clinicopathological parameters and neoangiogenesis (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). The Breast (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S35-36. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledition.com> (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження надмірної експресії циклооксигенази-2 в потрійному негативному раку грудної залози, підготовці тез до друку).
26. Volos L., Dudash A. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer and relationship with clinicopathological factors (18th St. Gallen International Breast Cancer Conference, Vienna 15-18.03.2023). The Breast (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S36-37. <https://breast-ibcc-2023.elsevierdigitaledition.com> (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження морфологічних особливостей ангиогенезу і взаємозв'язку з клініко-патологічними чинниками, узагальненні результатів, підготовці тез до друку).
27. Волос Л.І., Дудаш А.П. Прогнозування значення показників CD3 лімфоцитів на інвазивному краї в потрійному негативному фенотипі інфільтративного протокового раку грудної залози. Proceedings of the 7th International scientific and practical conference, March 29–31, 2023. BoScience

Publisher. Boston, USA, 2023; 87-92. URL: <https://sciconf.com.ua/vii-mizhnarodna-naukovo-praktichna-konferentsiya-progressive-researchin-the-modern-world-29-31-03-2023-boston-ssha-arhiv/> (Особистий внесок – в узагальненні результатів дослідження Т-лімфоцитів на інвазивному краї в потрійному негативному раку грудної залози і значення для прогнозу захворювання, підготовці тез до друку).

Наукові праці, які додатково відображають наукові результати дисертації:

28. Волос Л.І., Дудаш А.П. Молекулярний тип раку грудної залози як прогностичний фактор метастазування. Науковий журнал «Медичний форум», 2019; 17(17): 18-20. (Особистий внесок – провів аналіз різних молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
29. Волос Л.І., Дудаш А.П. Надмірна експресія циклооксигенази-2 (COX-2) в потрійно-негативному і HER2/neu-позитивному фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози. Південноукраїнський медичний науковий журнал. 2022; 31: 4-10. (Особистий внесок – провів аналіз експресії циклооксигенази-2 різних в потрійно-негативному і HER2/neu-позитивному фенотипах інвазивного протокового раку грудної залози, сформулював висновки, підготував матеріали до друку).
30. Діагностичне і прогностичне значення пухлинного ангіогенезу в інфільтративному протоковому раку грудної залози: інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №2-2023 / Л. І. Волос, А. П. Дудаш; ЛНМУ.– 4 с.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації

1. 14th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists (May 10-13th, 2018, Warsaw, Poland) – стендова доповідь, публікація тез;
2. XVII Конгрес Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (м. Тернопіль, 20-21 вересня 2018 року) – публікація тез;
3. X Конгрес Асоціації патологів України (м. Івано-Франківськ, 27-28 вересня 2018 року) – публікація тез;
4. Міжнародна науково-практична конференція «Сучасна патоморфологічна діагностика в клінічній практиці лікаря» (м. Вінниця, 10-11 квітня 2019 року) – публікація тез;
5. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI ст.» (м. Львів, 25–26 травня 2019 року) – публікація тез;
6. Підсумкова LXII науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини, присвячена 165-річчю від Дня народження Івана Яковича Горбачевського» (Тернопіль, 13 черв. 2019 р.) – публікація тез;
7. Міжнародна науково-практична конференція «Теоретичні та практичні аспекти розвитку сучасної медицини» (м. Львів, 21–22 червня 2019 року) – публікація тез;
8. 3rd International scientific and practical conference (24-26 May, Athens, Greece. 2020) – публікація тез, сертифікат;
9. Міжнародна науково-практична конференція «Здоров'я людини у сучасному світі: питання медичної науки та практики» (м. Одеса, 15-16 травня 2020 р.) – публікація тез;
10. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання розвитку медичних наук у XXI ст.» (м. Львів, 22–23 травня 2020 р.) – публікація тез;

11. XVIII Конгрес Світової Федерації Українських Лікарських Товариств (СФУЛТ) (м. Львів, 1-3 жовтня 2020 р.) – публікація тез;
12. International scientific conference "Medicine and health care in modern society: actual problems and modern aspects" (February 26-27, 2021. Lublin, Poland) – публікація тез;
13. 17th St. Gallen International Breast Cancer Conference Online worldwide (17–21 March 2021) – стендова доповідь, публікація тез;
14. International scientific and practical conference "Scientific progress of medicine and pharmacy of the EU countries" (April 23-24, 2021, Częstochowa, Poland) – публікація тез;
15. XXII Zjazd Polskiego Towarzystwa Patologów, Poznan, 13-15.10.2022) – стендова доповідь, Диплом 1 ступеня;
16. 18th St. Gallen International Breast Cancer Conference (Vienna 15-18.03.2023) – стендова доповідь, публікація тез, сертифікат;
17. 7th International scientific and practical conference (March 29–31, 2023. Boston, USA, 2023) – публікація тез, сертифікат.

ДОДАТОК В

Впровадження результатів досліджень



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиції для впровадження:** «Патоморфологічні особливості різних молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози»
2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини. Автори: професор кафедри патологічної анатомії та судової медицини, доктор медичних наук, професор Волос Л.І., аспірант кафедри патологічної анатомії та судової медицини Дудаш А.П.
3. **Джерела інформації:** VolosLI, DudashAP. Invasive ductal breast carcinoma: morphological features of molecular subtypes. The modern stage of the development of medical education in Ukraine and EU countries: Collective monograph Medical University of Lublin; Riga, Latvia: "Baltija Publishing", 2021. P.50-66. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-090-2-3>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України.
5. **Термін впровадження:** з січня 2023 р. по теперішній час.
6. **Форми впровадження:** у навчальний процес – у матеріали лекцій і практичних занять з патоморфології, а також у наукову роботу кафедри.
7. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Пропозиція обговорена і затверджена на методичному засіданні кафедри патологічної анатомії та судової медицини Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького МОЗ України (протокол № 7 від 17.01 2023 р.).

Завідувач кафедри патологічної анатомії
та судової медицини
Львівського національного
медичного університету імені Данила Галицького
доктор медичних наук, професор

Поспішіль Ю.О.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Проректор з наукової роботи
 Львівського національного медичного
 університету імені Данила Галицького,
 д. мед.н., проф. _____ Наконечний А.Й.
 « 31 » _____ 2022 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: «Скануюча електронна мікроскопія інвазивного протокового раку грудної залози»

2. Установа-розробник: Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, асп. Дудаш А.П.

3. Джерела інформації: Волос Л.І., Дацюк Ю.Р., Дудаш А.П. Скануюча електронна мікроскопія інвазивного протокового раку грудної залози/ Scanning electron microscopy of invasive ductal breast cancer. Lviv Medical Journal /Acta Medica Leopoliensia. 2021; Vol. 27 No. 3-4: 9-25. DOI: <https://doi.org/10.25040/aml2021.3-4.009>

4. Базова установа, яка проводить впровадження: Лабораторія електронної мікроскопії кафедри гістології, цитології та ембріології та кафедри нормальної анатомії Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького.


5. Термін впровадження: травень – вересень 2022 р.

6. Форми впровадження: у наукову роботу лабораторії електронної мікроскопії.

Затверджено на засіданні кафедри оперативної хірургії з топографічною анатомією (протокол № 1 від 30. 08. 2022 р.).

Відповідальний за впровадження:

Завідувач лабораторії електронної мікроскопії
 Львівського національного
 медичного університету імені Данила Галицького
 кандидат медичних наук, доцент

 С.В. Пальтов

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Заступник генерального директора
з лікувальної роботи комунального
некомерційного підприємства

Львівської обласної ради

«Львівський онкологічний регіональний
лікувально-діагностичний центр»



О.В. Тріль

« 01 » 06 2023 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Діагностичне і прогностичне значення пухлинного ангиогенезу в інфільтративному протоковому раку грудної залози.
 2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, Автори: професор кафедри патологічної анатомії та судової медицини, доктор медичних наук, професор Волос Л.І., аспірант кафедри патологічної анатомії та судової медицини Дудаш А.П.
 3. **Джерела інформації:** Volos L., Dudash A. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer and relationship with clinicopathological factors. The Breast (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S36-37; Волос Л.І., Дудаш А.П. Діагностичне і прогностичне значення пухлинного ангиогенезу в інфільтративному протоковому раку грудної залози: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 2-2023 / Л. І. Волос, А. П. Дудаш; ЛНМУ, 2023. – 4 с.
 4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** патологоанатомічне відділення некомерційного підприємства Львівської обласної ради «Львівський онкологічний регіональний лікувально-діагностичний центр»
 5. **Термін впровадження:** з березня 2023 р. по теперішній час.
 6. **Форми впровадження:** у практичну роботу патологоанатомічного відділення.
 7. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.
- Затверджено на засіданні колективу патологоанатомічного відділення (протокол № 5 від 01.06 2023 р.).

Відповідальна за впровадження:

Завідувачка патологоанатомічного відділення
некомерційного підприємства Львівської обласної ради
«Львівський онкологічний регіональний
лікувально-діагностичний центр»

Фещур Х.Р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор Рівненської обласної
клінічної лікарні імені Юрія Семенюка
Рівненської обласної ради

_____ В.О. Ткач
« 30 » 06 _____ 2023 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до лікувально-діагностичного процесу

1. **Пропозиції для впровадження:** морфологічні особливості інвазивного протокового раку грудної залози, діагностичне значення пухлинного ангиогенезу.
2. **Установарозробника:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, Автори: професор кафедри патологічної анатомії та судової медицини, доктор медичних наук, професор Волос Л.І., аспірант кафедри патологічної анатомії та судової медицини Дудаш А.П.
3. **Джерела інформації:** VolosLI, DudashAP. Invasive ductal breast carcinoma: morphological features of molecular subtypes. The modern stage of the development of medical education in Ukraine and EU countries: Medical University of Lublin, 2021. Collective monograph. Riga, Latvia: "Baltija Publishing", 2021: 50-66; Volos L., DudashA. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer and relationship with clinicopathological factors. The Breast (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S36-37; Волос Л.І., Дудаш А.П. Діагностичне і прогностичне значення пухлинного ангиогенезу в інфільтративному протоковому раку грудної залози: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 2-2023 / Л. І. Волос, А. П. Дудаш; ЛНМУ, 2023. – 4 с.
4. **Впроваджено:** патоморфологічна діагностики інвазивного протокового раку грудної залози.
5. **Термін впровадження:** червень 2023 р.
6. **Базова установа, яка проводить впровадження:** патологоанатомічне відділення комунального підприємства «Рівненська обласна клінічна лікарня імені Юрія Семенюка» Рівненської обласної ради
7. **Форма впровадження:** упрактичну роботу патологоанатомічного відділення – для покращення патоморфологічної діагностики інвазивного протокового раку грудної залози
8. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач патологоанатомічного відділення
КП «РОКЛ імені Ю.Семенюка» РОР

Б.І. Богославець

« 30 » 06 _____ 2023 р.

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Директор
ТзОВ «Західноукраїнська гістологічна
лабораторія» Гулей Р.В.

« 1 »

2023 р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Діагностичне і прогностичне значення пухлинного ангиогенезу в інфільтративному протоковому раку грудної залози.
2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, Автори: професор кафедри патологічної анатомії та судової медицини, доктор медичних наук, професор Волос Л.І., аспірант кафедри патологічної анатомії та судової медицини Дудаш А.П.
3. **Джерела інформації:** Volos L., Dudash A. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer and relationship with clinicopathological factors. The Breast (Scopus, Web of Science, Q1). 2023; Vol. 68 (1S): S36-37; Волос Л.І., Дудаш А.П. Діагностичне і прогностичне значення пухлинного ангиогенезу в інфільтративному протоковому раку грудної залози: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 2-2023 / Л. І. Волос, А. П. Дудаш; ЛНМУ, 2023. – 4 с.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** ТзОВ «Західноукраїнська гістологічна лабораторія».
5. **Термін впровадження:** з березня 2023 р. по теперішній час.
6. **Форми впровадження:** у практичну роботу гістологічної та імуногістохімічної лабораторії.
7. **Зауваження і пропозиції:** не вносилися.

Затверджено на засіданні колективу лабораторії

(протокол № 1 від 1 березня 2023 р.).

Відповідальний за впровадження:
Лікар-патологоанатом

О.А. Петрончак

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Директор
ТЗОВ «Західноукраїнська гістологічна
лабораторія» Гудей Р.В.

березень 2022 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Експресія СОХ-2 в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози».
2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, асп. Дудаш А.П.
3. **Джерела інформації:** Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості експресії СОХ-2 в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu). 2022; Том 7, № 1 (35): 68–78. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.01.068>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** ТЗОВ «Західноукраїнська гістологічна лабораторія».
5. **Термін впровадження:** березень – серпень 2022 р.
6. **Форми впровадження:** у практичну роботу гістологічної та імуногістохімічної лабораторії.

Затверджено на засіданні колективу лабораторії

(протокол № 1 від 1 березня 2022 р.).

Відповідальний за впровадження:
Лікар-патологоанатом

Петрончак О.А. Петрончак

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Експресія молекул клітинної адгезії E-кадгерину в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози».
2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, асп. Дудаш А.П.
3. **Джерела інформації:** Волос Л.І., Дудаш А.П. Особливості експресії молекул клітинної адгезії E-кадгерину в різних молекулярних підтипах інвазивного протокового раку грудної залози. Український журнал медицини, біології та спорту (Ukr. ž. med. biol. Sportu). 2022; Том 7, № 3 (37): 52–64. <https://doi.org/10.26693/jmbs07.03.052>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** ТзОВ «Західноукраїнська гістологічна лабораторія».
5. **Термін впровадження:** липень – вересень 2022 р.
6. **Форми впровадження:** у практичну роботу гістологічної та імуногістохімічної лабораторії.

Затверджено на засіданні колективу лабораторії

(протокол № 4 від 1 липня 2022 р.).

Відповідальний за впровадження:
Лікар-патологоанатом

О.А. Петрончак

«ЗАТВЕРДЖУЮ»




АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Лімфоїдне мікрооточення в інвазивному протоковому раку грудної залози».
2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, асп. Дудаш А.П.
3. **Джерела інформації:** Volos LI, Dudash AP. Tumor-infiltrating lymphocytes in nonluminal invasive ductal breast carcinoma. Azerbaijan Medical Journal (Scopus: Q4). 2022; 1: 131–137. DOI: <https://doi.org/10.34921/amj.2022.1.021>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** ТзОВ «Західноукраїнська гістологічна лабораторія».
5. **Термін впровадження:** квітень – вересень 2022 р.
6. **Форми впровадження:** у практичну роботу гістологічної та імуногістохімічної лабораторії.

Затверджено на засіданні колективу лабораторії
(протокол № 2 від 4 квітня 2022 р.).

Відповідальний за впровадження:
Лікар-патологоанатом

 О.А. Петрончак

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Директор
ТзОВ «Західноукраїнська гістологічна
лабораторія» Гулей Р.В.
3 травня 2022 р.


АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Експресія CD31 і морфологічні особливості пухлинного ангиогенезу в інвазивному протоковому раку грудної залози».
2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, асп. Дудаш А.П.
3. **Джерела інформації:** Volos LI, Dudash AP. Morphological features of tumor angiogenesis in invasive ductal breast cancer. *Periodyk Naukowy Akademii Polonijnej (PNAP), Czestochowa (Poland)*. 2022; 50(1): 269-280. DOI: <https://doi.org/10.23856/5032>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** ТзОВ «Західноукраїнська гістологічна лабораторія».
5. **Термін впровадження:** травень – вересень 2022 р.
6. **Форми впровадження:** у практичну роботу гістологічної та імуногістохімічної лабораторії.

Затверджено на засіданні колективу лабораторії

(протокол № 3 від 2 травня 2022 р.).

Відповідальний за впровадження:
Лікар-патологоанатом

 О.А. Петрончак

«ЗАТВЕРДЖУЮ»




Директор
ТзОВ «Західноукраїнська гістологічна
лабораторія» ~~Гулей Р.В.~~
травень 2021 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** «Морфологічні особливості молекулярних підтипів інвазивного протокового раку грудної залози».
2. **Установа-розробник:** Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, МОЗ України, кафедра патологічної анатомії та судової медицини, асп. Дудаш А.П.
3. **Джерела інформації:** Volos LI, Dudash AP. Invasive ductal breast carcinoma: morphological features of molecular subtypes. The modern stage of the development of medical education in Ukraine and EU countries: Medical University of Lublin, 2021. Collective monograph. Riga, Latvia: "Baltija Publishing", 2021: 50-66. DOI: <https://doi.org/10.30525/978-9934-26-090-2-3>
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** ТзОВ «Західноукраїнська гістологічна лабораторія».
5. **Термін впровадження:** травень – грудень 2021 р.
6. **Форми впровадження:** у практичну роботу гістологічної та імуногістохімічної лабораторії.

Затверджено на засіданні колективу лабораторії
(протокол № 3 від 4 травня 2021 р.).

Відповідальний за впровадження:
Лікар-патологоанатом


О.А. Петрончак