

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

Кваліфікаційна наукова праця

На правах рукопису

КОЛОМІЄЦЬ ОЛЕНА ОЛЕГІВНА

УДК 618.19-006-076-089(477.52)(043.5)

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПАТОМОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ТА ОПТИМІЗАЦІЯ
ДІАГНОСТИКИ ТА ПРОГНОЗУ ІНВАЗИВНОГО ПРОТОКОВОГО
РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ З БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЄЮ**

222 – Медицина
22 - Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

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

_____ О.О. Коломієць

Науковий керівник – **Москаленко Роман Андрійович**, доктор медичних наук, професор.

Суми – 2023

АНОТАЦІЯ

Коломієць О. О. Патоморфологічна характеристика та оптимізація діагностики та прогнозу інвазивного протокового раку грудної залози з біомінералізацією. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 22 – Охорона здоров'я. – Сумський державний університет, МОН України, Суми, 2023.

Рак грудної залози (РГЗ) є важливою медичною і соціальною проблемою, оскільки являється основною причиною смертності жінок від раку у всьому світі. Мікрокальцифікати у тканині грудної залози (ГЗ) відіграють важливу роль у розвитку патологічного процесу та впливають на гірший прогноз та метастазування. Їх присутність у тканині РГЗ є критерієм для визначення стадії захворювання та ранньої і диференційної діагностики РГЗ.

Також важливим для оцінювання клінічного статусу та прогнозування ризиків розвитку ускладнень у разі злоякісних новоутворень, в тому числі як метастазування в різні органи, є використання дослідження пухлинного клітинного мікрототочення та метастатичного потенціалу пухлини.

У дисертаційному дослідженні вивчається та вирішується важлива проблема – оптимізації діагностики та оцінки перебігу раку грудної залози з біомінералізацією. У процесі роботи над вирішенням актуальної проблеми були використані наступні методи дослідження: макроскопічні, гістологічні, гістохімічні, морфометричні, імуногістохімічні та фізико-хімічні методи (сканувальна та просвічувальна електронні мікроскопії, енергодисперсивна рентгенівська спектроскопія), статистична обробка даних з використанням параметричних та непараметричних критеріїв.

Дослідження проводилось на матеріалі, отриманому під час хірургічних операцій на базі Сумського обласного клінічного онкологічного центру (СОКОЦ). Також у ході проведення ретроспективного аналізу було вивчено 469 випадків пункційних біопсій інвазивного раку грудної залози з архіву

Наукового центру патоморфологічних досліджень кафедри патологічної анатомії СумДУ за період 2014-2019 років. Пункційні біопсії досліджені на предмет імуногістохімічної експресії рецепторів ER, PR, Her2-neu та наявності мікрокальцифікатів. Основне дослідження було проведене на 60 зразках тканини раку грудної залози. У роботі було заплановано вивчення 30 зразків пухлинної тканини з ознаками патологічної біомінералізації у вигляді мікрокальцифікатів, та 30 зразків раку грудної залози без ознак біомінералізації.

Отримані результатами дисертаційного дослідження виявили клініко-епідеміологічні особливості раку грудної залози в Сумській області у вигляді перевищення загальнодержавних показників захворюваності на РГЗ та їх зниження з початком пандемії COVID-19. За результатами дослідження поширеності РГЗ в Україні за областями (на 100 тис. жіночого населення) у період 2015-2020 років найбільша кількість випадків реєструється у м. Київ, Кіровоградській, Запорізькій, Сумській, Харківській та Херсонській областях, а найменші рівні показників захворюваності у Чернівецькій, Тернопільській, Рівненській, Івано-Франківській та Закарпатській областях. Середній показник рівня захворюваності на РГЗ у Сумській області впродовж 2015-2020 рр. складав ($79,62 \pm 6,5 \%$), що перевищувало загальнодержавний рівень ($74,1 \pm 3,74 \%$). Найвища захворюваність на РГЗ у Сумській області в зазначений період спостерігалась у м. Суми ($81,62 \pm 10,71$), Путивльському ($79,35 \pm 16,76$) та Роменському ($78,52 \pm 11,46$) районах. Найнижчий рівень захворюваності був у Липово-Долинському ($50,4 \pm 4,3$), Середино-Будському ($46,83 \pm 10,32$) та Білопільському ($41,93 \pm 11,31$) районах. Для Сумської області характерним є високий рівень захворюваності на РГЗ, проте у 2020 році простежується чітка тенденція до зниження цього показника внаслідок впливу пандемії вірусу SARS Cov-2 (Covid-19). На зростання кількості виявлених випадків РГЗ в Сумській області впливають комплекс чинників, зокрема покращання рівня якості клінічної та морфологічної діагностики в регіоні. Причинами високого рівня виявлення захворюваності в Сумській області є покращення

лабораторно-інструментальних методів діагностики, широке впровадження імуногістохімічне дослідження пухлин РГЗ для всіх пацієнтів, діагностичної трепанобіопсії ГЗ, сучасних маммографів, комп'ютерних та магнітнорезонансних томографів, доступу до молекулярно-генетичного тестування, покращення фінансування онкологічної галузі через механізми Національної служби здоров'я України (НСЗУ). Це підтверджується перевищенням загальнодержавних показників виявлення ранніх стадій РГЗ впродовж 2015-2020 років.

Комплексне гістохімічне дослідження зразків (зabarвлення алізариним червоним та за методом фон Косса) дозволило виявити присутність мікрокальцифікатів РГЗ різного фазового складу – оксалатів та фосфату кальцію. Спільне знаходження мікрокальцифікатів гідроксиapatитного і оксалатного фазового складу у частині випадків інвазивного раку ГЗ демонструє різну просторову локалізація мікрокальцифікатів, що свідчить про те, що біомінеральні депозити мають різні умови для формування мікрокальцифікатів. Цей факт вказує на те, що розвиток зляжисних пухлин ГЗ відбувається на фоні передіснуючої доброякісної патології, спадком якої є мікрокальцифікати, що складаються з оксалату кальцію. Ґрунтуючись на результатах дисертаційного дослідження були визначені діагностичні ознаки обох кристалічних форм мікрокальцифікатів, що може мати практичну цінність для клініцистів, зокрема патологів. За допомогою методів фізико-хімічного дослідження встановлено, що фосфат кальцію у структурі мікрокальцифікатів представлений у формі зрілого гідроксиapatиту із карбонатними заміщеннями.

Вивчення впливу мікрокальцифікатів РГЗ на імуногістохімічні особливості клітини раку грудної залози була використана панель маркерів на визначення чутливості до рецепторів естрогенів, прогестеронів, епідермального фактору росту 2, поляризації макрофагів на M1 та M1 фенотип, експресії остеобластичних маркерів.

При порівнянні зразків біопсій пацієнток з РГЗ виявлено відсутність статистично достовірної різниці імуногістохімічної експресії рецепторів Er, Pr та білка Her-2-neu у випадку наявності та відсутності мікрокальцифікатів.

Результати проведеного ІГХ дослідження вперше продемонстрували вплив патологічної біомінералізації РГЗ на підвищення експресії остеобластичних маркерів OPN, OPG, SPARC у групі зразків РГЗ з мікрокальцифікатами. Так, була виявлена статистично достовірну різниця експресії маркерів OPN ($p < 0,001$), OPG ($p < 0,01$), SPARC ($p < 0,05$) у тканині РГЗ з мікрокальцифікатами. Проте, пухлинна тканина не демонструвала достовірної різниці експресії RANKL ($p > 0,05$) між групами досліджуваних зразків РГЗ. Сукупність вказаних факторів може чинити частковий модулюючий ефект на клітини РГЗ та зумовлює розвиток їх специфічного остеобластичного профілю. Отримані дані можуть пролити світло на механізми розвитку віддалених метастазів РГЗ у кісткову тканину.

Також результати імуногістохімічного дослідження вказують на достовірно вищий рівень експресії CD68-позитивних макрофагів типу M1 у тканині зразків РГЗ з мікрокальцифікатами, у порівнянні зі зразками групи без ознак біомінералізації ($p < 0,05$). З іншого боку, було встановлено, що кількість CD163-позитивних макрофагів достовірно вища у тканині РГЗ без кальцифікатів. Можливим механізмом впливу мікрокальцифікатів на поляризацію макрофагів є підтримка ними хронічного запалення у тканинах і сприяння розвитку таким чином у макрофагах прозапального M1 фенотипу.

Результати дисертаційного дослідження можуть бути використані як теоретичний базис для оптимізації діагностики та оцінки ризику ускладнень раку грудної залози за допомогою патоморфологічних діагностичних методів.

Отримані результати, висновки та практичні рекомендації дисертації доповнюють та поглиблюють теоретичні уявлення щодо епідеміології, патогенезу раку грудної залози та розвитку метастазів до кісток. Наведені у дисертаційному дослідженні дані використовуються у навчальному процесі

при підготовці фахівців у галузі медицини на базі теоретичних і клінічних кафедр патологічної анатомії, патологічної фізіології та онкології.

Під час виконання дисертаційної роботи було запатентовано «Спосіб дослідження мікрокальцифікатів раку грудної залози з парафінових гістологічних блоків» (патент України на корисну модель № u202002521). Розроблена методика уже використовується науковій діяльності та є перспективною до впровадження у лікувально-діагностичну практичну роботу.

Ключові слова: рак грудної залози, імуногістохімічне дослідження, мікрокальцифікати, остеобластичні маркери, гідроксиапатит, оксалат, пухлинне мікрооточення, макрофаги M1, макрофаги M2.

ANNOTATION

Kolomiets O.O. Pathomorphological characteristics and optimization of diagnosis and prognosis of invasive ductal breast cancer with biomineralization. – Qualification scientific work as the manuscript.

Thesis for a Philosophy doctor degree by specialty 22 – health care – Sumy State University of Ministry of Education and Science of Ukraine, Sumy, 2023.

Breast cancer (BC) is a significant medical and social problem, as it is the leading cause of cancer-related mortality in women worldwide. Microcalcifications in the breast tissue play an essential role in the development of the pathological process and affect the worse prognosis and metastasis. Their presence in the tissue of BC is a criterion for determining the stage of the disease and early and differential diagnosis of BC.

It is also essential to evaluate the clinical status and predict the risks of complications in the case of malignant neoplasms, including metastasis to various organs, using the study of the tumor cell microenvironment and the metastatic potential of the tumor.

The dissertation study studies and solves a significant problem - optimization of diagnosis and assessment of the course of BC with biomineralization. In the process of solving the current situation, the following research methods were used: macroscopic, histological, histochemical, morphometric, immunohistochemical, and physicochemical methods (scanning and transmission electron microscopy, energy dispersive X-ray spectroscopy), statistical data processing using parametric and non-parametric criteria.

The study was conducted on material obtained during surgical operations at the Sumy Regional Clinical Oncology Center (SRCOC). Also, during the retrospective analysis, 469 cases of puncture biopsies of invasive breast cancer from the archive of the Scientific Center for Pathomorphological Research of the Department of Pathological Anatomy of Sumy State University for the period 2014-2019 were studied. Puncture biopsies were examined for immunohistochemical

expression of ER, PR, Her2-neu receptors, and microcalcifications. The preliminary study was conducted on 60 BC tissue samples. The work planned to study 30 samples of tumor tissue with signs of pathological biomineralization in microcalcifications and 30 samples of breast cancer without signs of biomineralization.

The dissertation research results revealed the clinical and epidemiological features of breast cancer in the Sumy region in the form of exceeding the national incidence rates of BC and their decrease with the onset of the COVID-19 pandemic. According to the results of the study of the prevalence of breast cancer in Ukraine by region (per 100,000 female population) in the period 2015-2020, the most significant number of cases was registered in Kyiv, Kirovohrad, Zaporizhzhia, Sumy, Kharkiv, and Kherson regions, and the lowest incidence rates in Chernivtsi, Ternopil, Rivne, Ivano-Frankivsk and Transcarpathian regions. The average indicator of the incidence of breast cancer in the Sumy region during 2015-2020 was ($79.62 \pm 6.5 \text{ ‰}$), which exceeded the national level ($74.1 \pm 3.74 \text{ ‰}$). The highest incidence of breast cancer in the Sumy region in the specified period was observed in the city of Sumy (81.62 ± 10.71), Putivlskyi (79.35 ± 16.76) and Romenskyi (78.52 ± 11.46) districts. The lowest incidence rate was in Lypovo-Dolinsky (50.4 ± 4.3), Seredino-Budsky (46.83 ± 10.32) and Bilopolsky (41.93 ± 11.31) districts. A high incidence of BC characterizes the Sumy region, however, in 2020, a clear tendency to decrease this indicator can be observed due to the impact of the SARS-Cov-2 (Covid-19) virus pandemic. The increase in the number of detected breast cancer cases in the Sumy region is influenced by a complex of factors, particularly improving the quality of clinical and morphological diagnostics in the area. The reasons for the high level of detection of morbidity in the Sumy region are the improvement of laboratory-instrumental methods of diagnosis, the comprehensive implementation of immunohistochemical examination of tumors of BC for all patients, diagnostic trepanobiopsy of BC, modern mammographs, computer and magnetic resonance imaging machines, access to molecular genetic testing, improved financing of the oncology industry through the mechanisms of the

National Health Service of Ukraine (NHSU). This is confirmed by exceeding the national indicators of detection of early stages of BC during 2015-2020.

A complex histochemical study of the samples (staining with alizarin red and by the von Koss method) revealed the presence of microcalcifications of BC of different phase compositions - oxalates and calcium phosphate. The common finding of microcalcifications of hydroxyapatite and oxalate phase composition in some cases of invasive gastric cancer demonstrates different spatial localization of microcalcifications, which indicates that biomineral deposits have other conditions for the formation of microcalcifications. This fact suggests that the development of malignant tumors of the gastrointestinal tract occurs against the background of preexisting benign pathology, the legacy of which is microcalcifications consisting of calcium oxalate. Based on the results of the dissertation study, the diagnostic features of both crystalline forms of microcalcifications were determined, which can be of practical value for clinicians, in particular, pathologists. With the help of physical and chemical research methods, it was established that calcium phosphate in the structure of microcalcifications is in the form of mature hydroxyapatite with carbonate substitutions.

Studying the effect of microcalcifications of BC on immunohistochemical features of breast cancer cells, a panel of markers was used to determine sensitivity to estrogen, progesterone, epidermal growth factor 2-neu receptors, the polarization of macrophages to M1 and M1 phenotype, expression of osteoblastic markers. When comparing biopsy samples from patients with BC, it was found that there was no statistically significant difference in the immunohistochemical expression of Er, Pr receptors, and Her-2-neu protein in the presence and absence of microcalcifications.

The results of the IHC study, for the first time, demonstrated the effect of pathological biomineralization of BC on increasing the expression of osteoblastic markers OPN, OPG, and SPARC in the group of BC samples with microcalcifications. Thus, a statistically significant difference in the expression of OPN ($p < 0.001$), OPG ($p < 0.01$), and SPARC ($p < 0.05$) markers was found in the tissue of BC with microcalcifications. However, the tumor tissue did not show a

significant difference in the expression of RANKL ($p > 0.05$) between the groups of the studied BC samples. The combination of these factors can have a partial modulating effect on the cells of the BC and causes the development of their specific osteoblastic profile. The obtained data can shed light on the mechanisms of the development of distant metastases of BC in bone tissue.

Also, the results of the immunohistochemical study indicate a significantly higher level of expression of CD68-positive macrophages of the M1 type in the tissue of BC samples with microcalcifications compared to the samples of the group without signs of biomineralization ($p < 0.05$). On the other hand, it was established that the number of CD163-positive macrophages is significantly higher in the tissue of BC without calcifications. A possible mechanism of the effect of microcalcifications on the polarization of macrophages is their support of chronic inflammation in tissues, thus promoting the development of the pro-inflammatory M1 phenotype in macrophages.

The dissertation research results can be used as a theoretical basis for optimizing diagnosis and assessing the risk of breast cancer complications using pathomorphological diagnostic methods. The obtained results, conclusions, and practical recommendations of the dissertation supplement and deepen the theoretical understanding of the epidemiology, the pathogenesis of breast cancer, and the development of bone metastases. The data presented in the dissertation research are used in the educational process of training specialists in medicine based on theoretical and clinical departments of pathological anatomy, pathological physiology, and oncology.

During the dissertation work, the "Method of study of breast cancer microcalcifications from paraffin histological blocks" was patented (utility model patent of Ukraine No. u2020 02521). The developed technique is already used in scientific activity and is promising for implementation in medical and diagnostic practical work.

Key words: breast cancer, immunohistochemical study, microcalcifications, osteoblastic markers, hydroxyapatite, oxalate, tumor microenvironment, M1 macrophages, M2 macrophages.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Piddubnyi A., Kolomiets O., Danilchenko S. et al. The Prospects of Using Structural Phase Analysis of Microcalcifications in Breast Cancer Diagnostics. *Diagnostics*. 2023. №13, 737. (**Scopus**) (Дисертантом проведено гістологічне, імуногістохімічне, гістохімічне дослідження зразків, дослідження отриманих результатів, підготовка статті до друку).
2. Kovalev V., Diachenko Y., Malyshev V. et al. Comparative features of open source software products for the development of an automated breast cancer diagnostic program. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2019. №7. С. 377–385. (Дисертантом самостійно проведено пошук літературних джерел, їх аналіз та узагальнення).
3. Kolomiets O., Moskalenko R. Breast cancer with microcalcificates: a bibliometric analysis. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2022. №10. С. 300-308 (Дисертантом створений дизайн дослідження, пошук літератури та їх аналіз, узагальнення результатів).
4. Коломієць О. О., Москаленко Р. А. Статистичний аналіз раку грудної залози в Україні та Сумській області за 2015-2020 роки. *Науковий вісник Ужгородського університету*. 2023. №1. С. 75–79. (Дисертантом самостійно проведений пошук, статистичний аналіз показників, аналіз результатів та сформульовані висновки).
5. Kolomiets O., Moskalenko R. Immunohistochemical study of M1 and M2 macrophages in breast cancer with microcalcifications. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2023. №11. С. 155–163. (Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження, проаналізовані отримані результати, сформульовані).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. Kolomiets O., Yazykov O., Lukavenko I. et al. The existence of calcifications in breast cancer tissue doesn't affect expression of HER2-neu protein. *European Journal of Pathology*. 2020. 447 (Suppl 1): S 226 (Дисертантом проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження зразків, статистичний аналіз).

7. Kolomiets O., Yazykov O., Moskalenko R. Osteopontin overexpression in invasive ductal breast carcinoma with mineralization. *Biomedical perspectives*. 2021. С. 97 (Дисертантом було проведено імуногістохімічне дослідження, аналіз результатів, сформульовані висновки дослідження).

8. Kolomiets O, Piddubnyi A, Danilchenko S. et al. Morphological and crystal-chemical features of breast cancer microcalcificates. 34rd European Congress of Pathology (3 – 7 September 2022). Virchows Archiv - Berlin, Germany: Springer. 2022. 481 (Suppl 1): S 66 . PS-01-020 (Дисертантом проведено гістохімічне дослідження, аналіз отриманих результатів та сформульовані висновки).

9. Kolomiets O., Piddubnyi A, Danilchenko S. et al. The role of oxalate nanocrystalline for differential diagnostics of the breast pathology. *Twenty third annual conference - YUCOMAT– 2022* (Дисертантом проведено гістохімічне дослідження, аналіз отриманих результатів та сформульовані висновки).

10. Kolomiets O., Piddubnyi A., Moskalenko R. and Stepanenko A. The Structure of Nano-crystalline Apatite From the Breast Cancer. 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP), 2022, pp. NRA04-1-NRA04-4, doi: 10.1109/NAP55339.2022.9934287 (Дисертантом проведено гістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та сформульовані висновки).

ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів	15
Вступ.....	16
Розділ 1. Огляд літератури.....	23
1.1. Інвазивний протоковий РГЗ: епідеміологія, етіологія, класифікація, діагностика	23
1.2. Мікрокальцифікати у тканині ГЗ: класифікація та етіологія, структура,	30
1.3. Бібліометричний аналіз літератури про мікрокальцифікати раку грудної залози.....	39
Розділ 2. Матеріали і методи дослідження	44
Розділ 3. Епідеміологічна характеристика раку грудної залози в Україні та Сумській області за 2015-2020 роки	49
Розділ 4. Ретроспективний аналіз впливу мікрокальцифікатів на експресію ER, PR ТА HER2-neu.....	59
Розділ 5. Дослідження тканини раку грудної залози з мікрокальцифікатами	66
Розділ 6. Дослідження тканини раку грудної залози без мікрокальцифікатів	78
Розділ 7. Морфологічний і фізико-хімічний аналіз мікрокальцифікатів РГЗ	88
Розділ 8. Аналіз та узагальнення результатів дослідження	95
Висновки	117
Практичні рекомендації	120
Примітки	121
Список використаної літератури	122
Додатки	147

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

РГЗ – рак грудної залози.

ДПГЗ – доброякісна патологія грудної залози.

ГЗ – грудна залоза.

МК – мікрокальцифікати.

ГА – гідроксиапатит.

СО – кальцію оксалат.

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я.

РЕА – раково-ембріональний антиген.

ЕМТ - епітеліально-мезенхімального трансформація.

BI-RADS - Breast Imaging Reporting and Data System.

DCIS - Ductal carcinoma in situ.

ПТАБ - пункційна тонкогольна аспіраційна біопсія.

УЗД – ультразвукове дослідження.

МТС – метастази.

ММП – матрична металопротеїназа.

ER – естроген.

PR – прогестерон.

HER2 neu – епідермальний фактор росту.

OPN – остеопонтин.

OPG – остеопротегерин.

SPARC – остеонектин.

RANKL – мембранний білок.

ІГХ – імуногістохімічне дослідження.

SEM/EDS – сканувальна електронна мікроскопія з енергодисперсійною спектроскопією.

XRD – рентгенодифракційне дослідження.

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Аналіз темпів росту онкологічної захворюваності у світі свідчить про те, що у XXI столітті онкологічна патологія посяде провідне місце в структурі захворюваності та смертності населення [1]. Наприклад, у 2018 році показники онкологічної захворюваності досягали 18,1 та 9,6 млн, що підтверджує актуальність проблеми [2]. Аналіз онкологічної захворюваності в Україні засвідчує відповідність глобальних епідеміологічних трендів до зростання цих показників [3].

Рак грудної залози (РГЗ) є важливою медичною і соціальною проблемою, оскільки являється основною причиною смертності жінок від раку у всьому світі. За даними ВООЗ у 2018 році у всьому світі було зафіксовано 2,1 мільйона нових випадків РГЗ та 627000 смертей [4, 5].

Мікрокальцифікати у тканині грудної залози (ГЗ) відіграють важливу роль у розвитку патологічного процесу та впливають на гірший прогноз та метастазування. Їх присутність у тканині РГЗ є критерієм для визначення стадії захворювання та ранньої і диференційної діагностики РГЗ [6, 7, 8].

Для оцінювання клінічного статусу та прогнозування ризиків розвитку ускладнень у разі злоякісних новоутворень, таких як метастазування в різні органи, використовується дослідження пухлинного клітинного мікрототочення. Пухлинне мікрооточення – важливий розділ досліджень в онкології, так як його роль у розвитку патологічного процесу, метастазуванні, гіршому прогнозі та рецидиву пухлин вже досліджується багато років та має актуальне значення серед умов сьогодення. Основну роль у розвитку проліферації неопластичних клітин, ангіогенезі та інвазії у навколишні тканини мають макрофаги, а саме макрофаги M1 та M2. Макрофаги типу M1 (CD68) має протизапальну і протипухлинну дію, а M2 (CD163) є імуносупресивним і виявляє про-пухлинну активність [9, 10, 11].

РГЗ, разом з раком передміхурової залози (РПЗ) є найбільш частими джерелами метастазів до кісткової системи [12]. Наприклад, для РПЗ була розроблена система CAPRA, що враховує 5 змінних, в основному біохімічних показників [13]. На нашу думку, пошук і впровадження у клінічну практику нового діагностичного методу, який дасть змогу оцінити метастатичний потенціал РГЗ є перспективним напрямом покращення якості і тривалості життя пацієнтів.

Покращення лікування та ранньої діагностики призводить до підвищення рівня виживаності пацієток з раком грудної залози останніми роками [14]. Рання діагностика РГЗ найбільш важлива, так як рівень 5-річний терміну виживання для I стадії РГЗ складає близько 100%, а для 4 стадії складає лише 20% пацієнтів [15]. Ключове досягнення для ранньої діагностики є запровадження скринінгових програм мамографії у жінок з групи ризику [16]. Одним з найважливіших ознак раку грудної залози при мамографії є мікрокальцифікати. Патологічні біомінеральні депозити можуть бути, як маркером типу патології грудної залози, так і виступати у ролі індикатора на етапі ранньої діагностики РГЗ [17]. Мікрокальцинати раку молочної залози зазвичай пов'язані з дегенеративно-некротичними змінами пухлинної тканини [18]. Наявність мікрокальцифікатів у молочній залозі корелює з гіршим прогнозом, особливо через більшу частоту інвазії лімфатичних вузлів і швидкого метастазування [19]. Виявлені особливості мікрокальцифікатів дозволяють розділити їх на дві групи – оксалатного та гідроксиапатитного походження. Важливо зазначити, що кальцифікати типу I (оксалатні) вважаються індикатором доброякісної патології грудної залози, тоді як конкременти типу II (гідроксиапатитні) є асоційованими з РГЗ [20]. Детальне вивчення структури і природи мікрокальцифікатів грудної залози допоможе покращити рівень ранньої діагностики злоякісних пухлин цього органу.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження виконане згідно з планом наукових досліджень кафедри патологічної анатомії Медичного інституту Сумського державного

університету та є частиною науково-дослідної роботи «Стан мінералізованих тканин при застосуванні нових композитів з наночастинками Ag⁺ та Cu²⁺» (номер державної реєстрації 0121U100471, 2021–2023 рр.), в якій авторка була виконавцем, та частиною науково-дослідної роботи «Розробка автоматизованої програми диференційної діагностики новоутворень молочної залози з морфометричною оцінкою рецепторного статусу ракових клітин» (за договором від 25.07.2019 р. № М/115-2019), у якій дисертантка виконала розділ дослідження щодо вивчення морфологічних та імуногістохімічних особливостей тканини раку грудної залози.

Тема дисертації була затверджена вченою радою Сумського державного університету МОН України (протокол № 4 від 14.11.2019).

Мета дослідження. Охарактеризувати патоморфологічні особливості інвазивного протокового раку грудної залози з біомінералізацією, з'ясувати склад та вплив мікрокальцифікатів на імуногістохімічні характеристики пухлини.

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз частоти та структури захворюваності на рак грудної залози в Сумській області та порівняти їх із загальнодержавними показниками за період 2015–2020 років за даними Національного канцер-реєстру України, відділу статистики Сумського обласного онкологічного диспансеру та Сумського обласного канцер-реєстру.

2. Установити особливості впливу мікрокальцифікатів на експресію рутинних клінічних маркерів (рецепторів естрогенів, прогестеронів, епідермального фактора росту Her-2-neu) тканиною раку грудної залози.

3. Визначити імуногістохімічні особливості тканини інвазивного протокового раку грудної залози з мікрокальцифікатами.

4. Проаналізувати імуногістохімічні особливості тканини інвазивного протокового раку грудної залози без мікрокальцифікатів (контрольної групи) і порівняти з результатами зразків РГЗ, які мають явища біомінералізації.

5. Вивчити патологічні біомінеральні утворення тканини інвазивного протокового раку грудної залози фізико-хімічними методами дослідження.

6. Оцінити роль мікрокальцифікатів РГЗ у формуванні остеобластичного імунофенотипу пухлинних клітин інвазивного протокового раку грудної залози.

Об'єктом дослідження є інвазивний протоковий рак грудної залози з біомінералізацією.

Предметом дослідження є клініко-морфологічні, молекулярно-біологічні, імуногістохімічні та фізико-хімічні ознаки тканин інвазивного протокового раку грудної залози з біомінералізацією.

Методи дослідження:

1. Макроскопічний метод: візуальне вивчення стану тканини пухлин грудної залози за умов патологічної біомінералізації.

2. Гістологічний метод із забарвленням тканини інвазивного протокового раку грудної залози гематоксилін-еозином.

3. Гістохімічний метод: забарвлення препаратів пухлин передміхурової залози за фон Коссом, алізариновим червоним, застосування PAS-реакції.

4. Імуногістохімічний метод: застосування антитіл до різних білків: рецепторів до естрогенів (Er), рецепторів до прогестеронів (Pr), епідермального фактора росту 2 (Her-2-neu), остеопонтину (OPN), остеопротегерину (OPG), остеонектину (SPARC), рецепторів до лігандів ядерного фактора κ -каппа, (RANKL), макрофагального кластера диференціації 68 (CD68), макрофагального кластера диференціації 163 (CD163).

5. Морфометричний метод: визначення основних обсягів структурних компонентів тканин інвазивного протокового раку грудної залози з біомінералізацією.

6. Рентгенодифракційне дослідження мінералізованого матеріалу.

7. Сканувальна та просвічувальна електронна мікроскопія.

8. Статистичні методи – застосування параметричних та непараметричних статистичних показників.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі детально охарактеризовано та проаналізовано епідеміологічний статус РГЗ серед жінок Сумської області. За результатами дослідження було виділено ряд факторів, що впливають на зміну і динаміку епідеміологічних РГЗ. Вперше було досліджено групу зразків РГЗ з мікрокальцифікатами за допомогою імуногістохімічної панелі рутинних, остеобластичних та макрофагальних маркерів та фізико-хімічних методів. Результати імуногістохімічного дослідження тканини РГЗ показують відсутність впливу мікрокальцифікатів на експресію рецепторів естрогенів, прогестеронів, епідермального фактора росту. Були виявлені статистично достовірні відмінності експресії остеобластичних маркерів OPN, SPARC, OPG, між біомінералізованою тканиною РГЗ та пухлинною тканиною контрольної групи. Дослідження маркерів макрофагів пухлинного мікрооточення M1 (CD68) та M2 (CD163) показало, що у тканинах зразків РГЗ з мікрокальцифікатами переважають прозапальні макрофаги з фенотипом M1, в той час, коли у контрольній групі зразків РГЗ виявлялося більше макрофагів M2. За співвідношенням Ca/P (і наявності слідів органічної речовини за результатами елементного картування) більшість мікрокальцифікатів пухлинної тканини РГЗ відповідають зрілому гідроксиапатиту. Також у частині зразків РГЗ були виявлені біомінеральні утворення, які не мали у своєму складі фосфору і за рівнем вмісту кальцію відповідали оксалатам. Одночасна наявність оксалатів та гідроксиапатитів кальцію свідчить про те, що біомінеральні депозити мають різні умови для формування мікрокальцифікатів, що непрямо підтверджується різною просторовою локалізацією мікрокальцифікатів.

Практичне значення одержаних результатів. За результатами дослідження було встановлено відсутність впливу мікрокальцифікатів РГЗ на експресію рецепторів естрогенів, рецепторів прогестеронів, епідермального фактора росту Her-2-neu. Також було виявлено вплив біомінеральних депозитів РГЗ на посилення експресії остеобластичних маркерів OPN, SPARC, OPG. Зазначені імуногістохімічні та морфологічні ознаки дають можливість

включити фактор наявності мікрокальцифікатів у діагностичні алгоритми РГЗ і використовувати їх наявність як прогностичний показник щодо оцінювання ризику розвитку ускладнень РГЗ, а саме метастазів до кісток. Було запропоновано алгоритм гістохімічного дослідження тканини РГЗ для виявлення і диференціації мікрокальцифікатів.

Під час виконання дисертаційного дослідження було отримано патент на корисну модель «Спосіб дослідження мікрокальцифікатів грудної залози з парафінових гістологічних блоків».

Результати дослідження можуть бути використані в практичній діяльності лікарів-патологоанатомів, лікарів-онкологів, лікарів-мамологів, радіологів, лікарів-хіміотерапевтів.

Матеріали дисертаційного дослідження впроваджені в навчальний процес на кафедрах патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, Буковинського державного медичного університету, Медичного інституту Сумського державного університету, Запорізького державного медичного університету, кафедрах патологічної анатомії з секційним курсом ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія» (м. Полтава), кафедрі загальної та клінічної патології Харківського національного медичного університету ім. В. О. Каразіна. Результати дослідження використовують у діагностичній роботі патологоанатомічного відділення Сумської обласної клінічної лікарні, приватних клінік «Надія», «Медея».

Особистий внесок дисертанта. Здобувачка самостійно сформувала дизайн дослідження, сформулювала мету та завдання, провела пошук та дослідження матеріалу, виконала гістологічне, гістохімічне, імуногістохімічне дослідження зразків тканин. Авторка самостійно провела пошук та аналіз літературних даних, виконала статистичне оброблення одержаних результатів та їх інтерпретацію, визначення основних положень, що виносяться на захист, оформлення дисертації і формулювання висновків. Рентгенодифракційне дослідження та інфрачервона спектроскопія були виконані в Інституті

прикладної фізики НАН України з консультативною допомогою кандидата фізико-математичних наук С. М. Данильченка.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені на: 31-му та 33-му Європейських конгресах патологів (м. Глазго, Шотландія, 2020; м. Базелі, Швейцарія, 2022), Міжнародній конференції YUKOMAT-23 (м. Герцег-Нові, Чорногорія, 2022), Міжнародній конференції NAP-2022 (м. Краків, Польща, 2022), Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих учених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини» (м. Суми, СумДУ, 2019, 2020). Дисертаційну роботу заслухано на міжкафедральному семінарі Медичного інституту Сумського державного університету 29 червня 2023 року.

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 10 наукових праць: 5 статей, з яких 4 – у наукових фахових виданнях України, 1 – у закордонному журналі, що індексуються наукометричною базою Scopus (Q2). За час роботи над дисертацією отримані результати були представлені у матеріалах 5 конференцій та конгресів, 4 з них обліковуються наукометричними базами даних Web of Science та Scopus.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 160 сторінках комп'ютерного тексту й складається з анотації, вступу, огляду літератури, розділу матеріалів і методів дослідження, результатів власних досліджень (7 розділів), аналізу та обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, приміток, списку використаних джерел, а також додатків. Робота містить 57 рисунків, 4 таблиці та список використаних джерел із 211 джерел (5 кирилицею та 206 латиницею).

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Інвазивний протоковий РГЗ: епідеміологія, етіологія, класифікація, діагностика

Епідеміологія

Сучасні статистичні дані свідчать про те, що патологічні процеси грудної залози (ГЗ) виявляються з частотою 13,5-30% і протягом останніх десятиліть відмічається приріст захворюваності кожного року [4, 5, 21].

РГЗ являється однією з найактуальніших проблем сучасної системи охорони здоров'я, що може бути пов'язано з значним ростом захворюваності та смертності від даної патології не тільки в Україні, але й у всьому світі. Рак грудної залози в Україні займає перше місце у жінок репродуктивної сфери у порівнянні з пухлинами іншої локалізації, а кількість хворих жінок цією нозологією має тенденцію до збільшення кожного року. РГЗ займає 30% захворюваності та 16-18% смертності від них [4, 21, 22]. За даними різних авторів у жінок репродуктивного віку від 40 до 80% діагностуються дисгормональні зміни ГЗ, що можуть підвищувати ризик виникнення РГЗ.

РГЗ є найбільш часто діагностованим раком у жінок (на що припадає 24% усіх пухлинних захворювань у жінок) і головною причиною смертності жінок від раку у всьому світі. Протягом останніх десятиліть у більшості країн із низьким і середнім рівнем доходу, таких як США, Канада, Франція, Австрія рівень захворюваності знизився на початку 2000-х років, що частково може пояснюватись зменшенням використання гормональної терапії в постменопаузі. У 2018 році у всьому світі було зафіксовано 2,1 мільйона нових випадків РГЗ та 627000 смертей. Відмічається, що дані захворюваності відрізняють більше ніж у 10 разів відповідно до географічного розташування. До груп найвищого рівня відносять території Австралії, Європи та Північної Америки, що може бути пов'язано з екологічними чинниками. [5, 21, 23]

В США дана патологія розвивається у кожної восьмої жінки, а у Європі хворіє кожна десята жінка. За останніми даними ВООЗ 627000 жінок померли від РГЗ, що складає 15% від усіх смертей жінок від раку, але іншої локалізації. Кожна жінка, яка захворіла РГЗ, в середньому втрачає 17-18 років життя, що складає 53% від усіх втрат жіночої популяції [4, 5, 21, 24].

Частота захворюваності на РГЗ росте зі збільшенням віку жінки (ця закономірність спостерігається до 60 років). Виділяють два піки захворюваності у віці між 45 і 50 роками, а другий - після 55 років.

Відмічається “омолодження” РГЗ, що свідчить про те, що жінки (до 40 років) хворіють вдвічі частіше, у порівнянні, ніж 30 років назад. В арабських державах дана патологія в 6-10 разів нижча, ніж в США та країнах Європи. Виділяють тенденцію, що жінки, які живуть у місті частіше хворіють на РГЗ, порівнянні з жительками сільської місцевості [5, 21, 25].

Дана захворюваність корелюється з кількістю факторів ризику у популяції, так наприклад в Україні, де найбільший рівень захворюваності спостерігається в Одеській, Харківській та Херсонській області, а найменший в Івано-Франківській та Рівненській області.

Треба відмітити, що незважаючи на велику поширеність даного захворювання, дуже важлива рання діагностика та оптимізація методів лікування на ранніх стадіях спрямованої на профілактику раннього та пізнього метастазування. Про що свідчать дані про показники п'ятирічного виживання хворих в залежності від стадії захворюваності: 0 ст. – 99%, I ст. – 92%, ІА ст. – 82%, ІБ ст. – 65%, ІІА ст. – 47%, ІІВ ст. – 44%, ІV ст. – 14% [26].

Етіологія

До факторів ризику розвитку РГЗ відносять генетичну схильність, раннє настання менструації (до 13 років), пізнє настання менопаузи (після 55 років). Хірургічна кастрація до 40 років може значно знижувати ризик РГЗ на 50% у порівнянні з жінками із природною менопаузою. Пізні пологи (після 35 років) також є можуть бути фактором, що підвищує ймовірність захворювання на рак грудної залози. Жінки, які мають близьку ступінь спорідненості з хворими на

РГЗ захворюваність на карциному грудної залози може бути в 2-3 рази вище, ніж у загальній популяції. За наявності РГЗ у рідної сестри ризик на захворюваність РГЗ збільшується у 8-9 разів [21, 22, 27].

Стосовно доброякісної патології грудної залози (ДПГЗ), приблизно 30% яких включають проліферативні ураження (проліферативне захворювання, тобто без атипії) і 65% охоплюють непроліферативні доброякісні ураження. Проліферативна ДПГЗ з атипією (атипова гіперплазія) становить 3–4% діагнозів та асоціюються з 4–5-кратним підвищенням ризику РГЗ [21, 22, 27].

Фактори ризику РГЗ умовно поділяють на 3 групи.

До низьких факторів ризику відносять (ризик вище, ніж у популяції, в 1-2 рази) відносять: замісна гормонотерапія, використання оральних контрацептивів, дієта насичена жирами, переривання першої вагітності [28, 29].

До середніх факторів ризику (ризик вище, ніж у популяції, в 2 – 3 рази) відносять: раннє менархе, пізня менопауза, перші роди після 30 років, безпліддя, високий соціально-економічний статус, наявність раку яєчників, ендометрія, товстого кишечника в анамнезі, часте вживання алкоголю, проліферативні захворювання ГЗ без атипії, ожиріння в постменопаузі. До високих факторів ризику (ризик вище, ніж у популяції, в 4 і більше разів) відносять: вік старше 50 років, місце народження (Північна Америка, Північна Європа), сімейний анамнез на РГЗ у родичів 1-ї лінії, РМЗ в анамнезі, дія іонізуючого випромінювання, проліферативні захворювання ГЗ з атипією, синдром Лі-Фраумені, мутація в генах BRCA-1, BRCA-2 [28, 29, 30, 31].

Враховуючи епідеміологічні дані, видно що РГЗ є діагнозом заможних суспільств, що пов'язано із західним способом життя, який характеризується висококалорійною дієтою, багатою тваринними жирами та білками, ожирінням, старший вік перших пологів та скорочення тривалості лактації. Також важливу роль у розвитку РГЗ відіграють екзогенні статеві стероїди (естрогени, прогестини) та порушення їх співвідношення, що призводить до дисгормональних змін в організмі жінки. Рівень захворюваності на РГЗ зростає з віком до менопаузи (на 8% на рік), ніж після (2% на рік), коли

припиняється синтез естрогенів і прогестеронів в яєчниках і вироблення андрогенів яєчниками поступово зменшується [21, 22, 32].

Стосовно впливу паління на розвиток РГЗ, є дані що свідчать про відсутність причинно-наслідкового зв'язку між активним курінням та РГЗ, але за даними мета-аналізу є свідчення про те, що є зв'язок між активним курінням і підвищенням ризику РГЗ для жінок, які почали палити раніше перших пологів [21, 22, 33, 34].

Важливу роль у розвитку РГЗ відіграє сімейний анамнез. Виділяють два типи гену, які підвищують розвиток РГЗ (BRCA1, BRCA2). Лінія BRCA1 асоційована з ризиком потрійного негативного (ER-негативного, PR-негативного та HER2-негативного) раку, натомість BRCA2 мутації пов'язані з РГЗ із позитивним гормональним рецептором [31, 32, 35].

Класифікація

За патоморфологічною ознакою патологію грудної залози поділяють на злоякісну та доброякісну, що є основою для верифікації діагнозу, лікування та прогнозу. Доброякісна патологія представлена: доброякісними епітеліальними проліферативними та передраковими захворюваннями (протокова гіперплазія, атипова протокова гіперплазія, хвороба стовпчастого епітелію та атипова протокова гіперплазія), аденомами, доброякісними склерозуючими захворюваннями, доброякісними папілярними пухлинами, епітеліально-міоепітеліальними пухлинами, фіброепітеліальними пухлинами (фіброаденоми) та філоїдна пухлина, гамартоми [21, 36].

До злоякісних захворювань ГЗ належать: папілярні утворення (протокова папілома *in situ*, інкапсульована папілярна карцинома, інкапсульована папілярна карцинома з інвазією, солідна папілярна карцинома *in situ*, солідна папілярна карцинома з інвазією, внутрішньопотокова папілярна аденокарцинома з інвазією), неінвазивна часткова неоплазія (атипова часткова гіперплазія, лобулярна карцинома *in situ* (класична часткова та флоридна), лобулярна карцинома *in situ*), протокова карцинома *in situ* (внутрішньопотокова карцинома низького, середнього та високого ядерного

класу), інвазивна карцинома ГЗ (інфільтруючий протоковий рак та та онкоцитарна карцинома), карциноми збагачені ліпідами та глікогеном, сальна, лобулярна, тубулярна, крибриформна, муциозна карциноми, муциозна цистаденокарцинома, інвазивна мікропапілярна карцинома ГЗ, апокринна аденокарцинома, метопластична карцинома [21, 36, 37, 38].

Виділяють клініко-анатомічну класифікацію РГЗ

1. Вузлова форма
2. Дифузна форма: а) набряково-інфільтративна; б) маститоподібна; в) бешихоподібна; г) панцирна.
3. Рідкі форми: а) рак Педжета (екземоподібна, псоріазоподібна, виразкова, пухлинна форми), б) атипова форма.

З метою верифікації уявлень про розмір пухлини та її поширеність перед початком лікування використовують міжнародну клінічну класифікацію (TNM), в якій враховують поширеність пухлини тільки по первинним симптомам [26, 39].

Виділяють два просвітні підтипи РГЗ: підтип А та підтип В, які експресують рецептори до естрогену (ER), прогестерону (PR), але не експресують HER 2 neu. Просвітній підтип А експресує PR і має низький тип проліферації, натомість як люмінальний тип В експресує ER та високий рівень HER 2 neu, з будь-якою проліферацією. Виділяють HER 2 neu позитивний підтип, але без експресії ER або PR та HER 2 neu потрійний негативний, відповідно з відсутністю експресії до ER, PR та HER 2 neu [39, 40].

Інвазивна карцинома грудної залози класифікується за морфологічно визначеними підтипами, в залежності від клінічно/біомаркерних показників, в основі яких лежить ER та Her2 neu статус. Виділяють такі підтипи:

- ER-позитивний, HER-2-негативний
- ER-позитивний, HER-2-позитивний
- ER-негативний, HER-2-позитивний
- ER-негативний, HER-2-негативний

У скринінгових популяціях найпоширенішим підтипом є рак з позитивним гормональним рецептором, при цьому HER2-позитивний рак становить 10-15%, ER-негативний/ HER2-негативний становить 13-17%. У популяціях без скринінгу часто є іншою, з вищою, що складає ER-негативний/HER2-негативний (20-40%) і HER2-позитивних видів раку (15-25%) [39, 40, 41].

Більшість випадків РГЗ можуть виникати в будь-якому квадранті грудної залози, з більшою частотою у верхньо-зовнішньому квадранті.

Молекулярна класифікація РГЗ

РГЗ неоднорідний на молекулярному рівні, має різні моделі експресії генів, що мають відмінності у прогнозі та перебігу захворювання. Класифікація базується на імуногістохімічній оцінці біомаркерів (ER, PR, HER2 та Ki-67) [40, 42].

Виділяють внутрішньомолекулярні підтипи РГЗ: люмінальний тип А, люмінальний тип В, HER2 позитивний підтип, потрійно негативний HER2 тип та базальноподібний. Дана класифікація базується в залежності від кластерного аналізу генів [41, 42, 43].

Виділяють клініко-патологічну класифікацію ранніх інвазивних підтипів РГЗ, яка була прийнята 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference Expert Panel, заснована на імуногістохімічних біомаркерах ER, PR, HER2 та Ki-67 [41, 44].

Люмінальний тип А характеризується експресією рецепторів: ER позитивна, PR позитивна, HER2 негативна реакції та індекс проліферації Ki-67 низький.

Люмінальний тип В характеризується експресією рецепторів: ER позитивна, HER2 негативна реакція та один з наступних: індекс KI 67 високий та PR негативний або низький. HER2 позитивний характеризується експресією рецепторів: HER2 гіперекспресія або посилена, ER відсутня та PR відсутня реакції. Потрійний негативний характеризується: ER - відсутня реакція, PR відсутня реакція та HER2 негативний [44, 45].

Діагностика

Рання діагностика РГЗ є важливою складовою в успішному лікуванні та сприятливому прогнозу у виживанні хворих.

Діагностика ГЗ починається з анамнезу, огляду та пальпації. Наступним етапом є інструментальна діагностика. У всьому світі для діагностики РГЗ прийнято застосовувати “Потрійний діагностичний стандарт”: фізикальне дослідження, мамографія та пункційна тонкогільна аспіраційна біопсія (ПТАБ). Найпоширенішим методом діагностики РГЗ вважають мамографію [46, 47].

Мамографія – рентгенологічне дослідження ГЗ. Цей метод є найбільш ефективним ранньої діагностики РГЗ, за допомогою якого можна виявити вогнища від 0,3 см та ознаки починаючого злоякісного процесу у ГЗ, а також диференціювати доброякісні та злоякісні утворення ГЗ. Мамографічне дослідження являється “золотим стандартом” у ранній діагностиці РГЗ, що дозволяє використовувати дане дослідження у якості диференційно-діагностичної та скринінгової методики [47, 48, 49].

Клітинні пухлинні маркери представляють собою антигени, які локалізовані на клітинних мембранах, тобто рецептори до гормонів та факторів росту. Ці маркери виявляють при імуногістохімічному (ІГХ) дослідженні пухлинної тканини. Практичне значення при РГЗ мають естрогенові рецептори, прогестеронові рецептори, HER2/neu (аналог рецепторів до факторів росту, продукт онкогена) та Ki-67 (маркер проліферації), а також мутацій генів-супресорів p53, BRCA1, BRCA2 (Breast cancer genes). Дані маркери мають вирішальне та важливе значення у прогностичній оцінці пухлини у плані агресії її росту та чутливості до хіміотерапії, або гормональної терапії [30, 41, 50, 51, 52].

До гуморальних пухлинних маркерів відносять білки групи СА (Carbohydrate Antigen) СА15-3, СА125, СА27-29, а також РЕА (раково-ембріональний антиген); МРА (муциноподібно-ракоасоційований антиген). Дані маркери використовують для оцінки ефективності лікування,

розповсюдження процесу. Також не мало важливим є дослідження гормонального профілю та імунного статусу хворих. До додаткових методів можна віднести УЗД (ультразвукове дослідження) ГЗ, яке уточнює картину патологічного процесу і є методом вибору для жінок до 35 років [53, 54].

1.2. Мікрокальцифікати у тканині ГЗ: класифікація та етіологія, структура

На біохімічному рівні біомінеральні депозити поділяють на два основних типи: тип I, що складається з оксалату кальцію (СО), і тип II, що складається з гідроксиапатиту (ГА). Класифікація заснована на хімічному складі та мамографічних характеристиках, включаючи морфологію, розподіл та щільність. Дані досліджень свідчать про те, що тип II часто асоціюється зі злякисними ураженнями ГЗ [55, 56, 57]. Біомінерали I типу мають бурштиновий колір, частково прозорі та за формою мають вигляд пірамідальних структур з плоскою поверхнею, а мінерали II типу мають біло-сірий колір, непрозорі, відповідно веретеноподібної або лущиноподібної форми з неправильною поверхнею. При аналізі більшості досліджень, можна стверджувати, що наявність оксалату кальцію частіше зустрічається у доброякісній патології ГЗ, або в неінвазивних карциномах *in situ*. З іншого боку, наявність ГА асоційована як з доброякісною патологією грудної залози, так і злякисною [58, 59, 60, 61].

СО виробляється апокринними клітинами і частіше за все пов'язаний з доброякісними змінами тканини грудної залози. СО не може метаболізуватися клітинами ссавців, це може вказувати на те, що його присутність метаболічно впливає на епітеліальні клітини та може індукувати проліферацію та надекспресію *c-Fos* в клітинах MCF-7 [61,62, 63].

Кальцифікати типу II можуть бути пов'язані з доброякісними та злякисними утвореннями ГЗ; вони присутні в доброякісних утворень, таких як фіброаденоми, фіброаденоз і склерозуючий аденоз, і асоційовані зі

зляжисним інвазивним раком в експериментальних моделях, а саме некрозом і фіброзом. Кальцифікати типу I зазвичай асоціюються з кістами або жировим некрозом, а типу II частіше пов'язані з аномальними епітеліальними клітинами [61, 63, 64, 65].

Важливе значення має не тільки виявлення мікрокальцифікатів, а й їх специфічні властивості. Морфологія біомінеральних депозитів може бути індикатором зляжисного процесу у ГЗ. Враховуючи дані мікроскопічного аналізу, біомінеральні депозити можна розподілити на три типи: поліморфні тіла, двозаломлюючі кристали та псаммомоподібні тільця [66, 67, 68]. В останній час багато досліджень вказують на зв'язок гістопатологічних варіантів РГЗ та фізико-хімічним складом мікрокальцифікатів. Описана присутність біомінералів з вмістом СО переважно в проліферативних формах фіброзно-кістозної мастопатії або лобулярних карциномах *in situ*, тоді як нанокристали з ГК були присутні в інвазивних зляжисних пухлинах ГЗ [68, 69, 70].

Рентгенологічні критерії відмінностей кальцифікатів

В даний час 30-50% РГЗ, що не пальпується, виявляється виключно за допомогою ідентифікації кальцинатів на мамографії. Існують добре описані рентгенологічні критерії, які допомагають відрізнити доброякісні кальцифікати від потенційно зляжисних. Мамографія є основним методом оцінки цих змін. Відповідно до п'ятої версії Системи звітів і даних щодо візуалізації грудей (BI-RADS), біомінерали класифікуються як доброякісні та підозрілі. Виділяють п'ять категорій розподілу: дифузні, сегментарні, регіональні, згруповані та лінійний. Доброякісні кальцифікати на мамографії, як правило, більш широкі, грубіші, кругліші з гладкими краями і легше помітні, ніж зляжисні кальцифікати. Кальцифікати, пов'язані зі зляжисними новоутвореннями, зазвичай мають невеликі розміри і часто вимагають збільшення, щоб бути добре візуалізованими. Підозріла морфологія включає грубий гетерогенний вигляд, аморфну природу, тонкі плеоморфні елементи та тонкорозгалужені кальцифікації [66, 68, 69, 71].

Морфологічно біомінерали з тонкими лінійними розгалуженнями асоціюються з гіршими результатами порівняно з нелінійними біомінералами. Виявлення та інтерпретація кальцифікатів представляють складну проблему, тому рентгенологічні та патологоанатомічні оцінки мають вирішальне значення для точної діагностики цих уражень. Тип і склад біомінералів, включаючи визначення їх біохімічної природи, можуть покращити їх прогностичну цінність [69, 71, 72].

Роль гідроксиапатиту кальцію у розвитку патології грудної залози

Також є дослідження, що вказують на те, що ГА які наявні у доброякісних патологіях ГЗ у своєму складі мають меншу кількість білка та більшу кількість карбонату кальцію, у порівнянні зі злоякісною патологією ГЗ. Існують дані, що наявність карбонату кальцію у гідроксиапатиті кальцію, який зменшується зі збільшенням ступеня ураження. В останніх дослідженнях вказується, що наявність ГА може впливати на мікрооточення пухлин, підсилювати мітоз пухлинних клітин та підвищувати їх проліферацію в грудній залозі [73, 74].

Описаний зв'язок простагладинів з екзогенним ГА, а саме простагладину типу E2 і його вираженою активністю у пухлинах ГЗ з наявністю гідроксиапатиту кальцію, враховуючи, що простагладини є маркером високого метастатичного потенціалу, то можна думати, що наявність ГК може впливати на перебіг та прогноз хворих на РГЗ. Була відмічена висока активність цитокіну IL-1b у пухлинах з наявністю ГА, який може сприяти розвитку запального мікросередовища. Також описаний взаємозв'язок ГА з матричними металопротеїназами (ММП), а саме його ролі у підвищенні цього ферменту у середовищі пухлини, які можуть деградувати базальну мембрану клітини, що дозволяє проникнути пухлинним клітинам у навколишні тканини [74, 75, 76, 77].

Диференційна діагностика кальцифікатів у ГЗ

Виділяють рентгенологічних ознак виділяють доброякісні кальцифікати, підозрілі кальцифікати та біомінеральні депозити, які вказують на високу ймовірність злоякісного новоутворення. Підозрілі кальцифікти частіше мають

аморфну чи грубу гетерогенну форму. Аморфні кальцифікати характеризуються утвореннями “без чітко визначеної форми”.

Згідно класифікації Breast Imaging Reporting and Data System (BI-RADS) аморфні кальцифікати можна поділити на такі типи: дрібного розміру.

- BI-RADS 2: при дифузному та двосторонньому прояві
- BI-RADS 3: при множинному двосторонньому прояві
- BI-RADS 4: при односторонньому згрупованому або новому спостереженні або у пацієнтки з раком контралатеральної грудної залози.

Стосовно грубих гетерогенних мікрокальцифікатів, то вони мають тенденцію до злиття та розміром більше 0,5 мм [76, 71, 78]. Їх присутність важливо відрізнити від дрібних плеоморфних, розмір яких складає до 0,5 мм, їх присутність може свідчити про ймовірність злякисного новоутворення. Гетерогенні кальцифікати можуть бути присутні у фіброаденомі ГЗ, фіброзі, в жировому некрозі. Наявність множинних гетерогенних мікрокальцифікатів з двосторонньою локалізацією можуть свідчити за доброякісну етіологію патології ГЗ. Якщо кальцифікати мають кластерний, лінійний, сегментарний розподіл може розглядатися, як протоковий рак *in situ* (DCIS). До кальцифікатів з вищою ймовірністю злякисного процесу відносять: тонкі плеоморфні мікрокальцифікати, тонкі лінійні, тонкі лінійні розгалуджені [71, 78, 79].

Згідно 5-го видання BI-RADS виділяють доброякісні кальцифікати та з підозрілою морфологією. До кальцифікатів з типовою доброякісною морфологією відносять: “шкірні”, “судинні”, “грубі або схожі на попкорн”, “великі паличкоподібні”, “круглі”, “ободкові”, “дистрофічні” та біомінерали по типу “кальцієвого молока” та “шовного матеріалу”. До кальцифікатів з підозрілою морфологією відносять: “аморфні”, “грубі неоднорідні”, “тонкі плеоморфні”, “тонкі лінійні або лінійні розгалуджені”. Вважають, що “аморфні”, “грубі гетерогенні” та “дрібні плеоморфні” мають менший ризик злякисності та відносять до категорії 4В, а “тонколінійні розгалуджені” до категорії 4С [71, 78, 79, 80].

Механізм формування кальцифікатів.

Основна увага дослідників приділяється у вивченні молекулярного механізму, що беруть участь у формуванні біомінералів. Механізм регулювання патологічної бомінералізації може бути подібний до фізіологічної мінералізації кісток [77, 81]. У біоптатах РГЗ була виявлена надмірна експресія білків кісткового матриксу – сіалопротеїну, остеопонтину (OPN) та остеонектину (SPARC).

Rizwan та інші, у своїх дослідженнях вказують, що інгібування гена OPN зменшує утворення гідроксиапатиту кальцію в клітинах РГЗ [82]. У цьому дослідженні описано наявність прямого зв'язку між відкладанням кальцію та здатністю клітин РГЗ метастазувати у віддалені органи та лімфатичні вузли.

Під впливом специфічних подразників епітеліальні клітини грудної залози, які зазнають епітеліально-мезенхімального переходу (ЕМП) і трансформуються у клітини з остеобластоподібним фенотипом можуть впливати на утворення біомінералів у тканині грудної залози. У цих же дослідженнях описано, що пухлинні клітини у тканині РГЗ з наявністю ГА були схожі на остеобласти. В основі ЕМП лежить процес зміни епітеліальними клітинами епітеліального фенотипу на мезенхімальний [81, 82].

Основним молекулярним механізмом зміни фенотипу у ЕМП є втрата маркерів епітеліальних клітин, таких як Е-кадгерин та цитокератин, та заміна їх мезенхімальними маркерами – віментином, ядерним β -катеніном, гладеньком'язевий актином та фібронектином. Дана патологічна трансформація призводить до активації сигнальних шляхів та реорганізації цитоскелета, підвищення експресії генів кодуєчих матриксних металопротеїназ (ММП), які приймають участь у деградації позаклітинного матриксу та базальної мембрани [82, 83]. Роль у метастатичному поширенні ракових клітин грудної залози ще вивчається, але існують дані досліджень про те, що ген OPN зв'язується з клітинною поверхнею інтегринів (інтегрин $\beta 1$ та $\beta 2$) та CD 44 .

Саме зв'язок OPN з клітинною поверхнею рецептору CD 44 та пошкодження епітеліально-мезенхімального переходу з подальшою

трансформацією клітин, є пусковим механізмом для ініціювання та адгезії клітинного матриксу при різних типах пухлин, що призводить до інвазії та метастазування злоякісних пухлин [81, 83, 84]. Основний механізм формування біомінералів досі мало вивчений. За даними останніх досліджень кісткові морфогенетичні білки 2 (BMP-2) відіграє певну роль у формуванні мікрокальцинатів. BMP є факторами росту TGF- β super сімейства та є специфічним і ключовим регулятором остеобластів [83, 84, 85]. BMP-2 може спонукати клітини PГЗ набувати остеобластних характеристик, що призводить до утворення мікрокальцинатів. Недавнє дослідження також показало, що активні процеси мікрокальцифікації обумовлені остеοімунологічними розладами. Одними з них є асоційовані з пухлиною макрофаги [86, 87].

Пухлинно-асоційовані макрофаги (ПАМ) представляють собою основні типи пухлин, що проникають в імунні клітини позаклітинного середовища і накопичуються навколо мікрокальцинатів при PГЗ [83, 84, 88].

Високі рівні ПАМ пов'язані з поганим прогнозом. ПАМ, які причетні до раку грудної залози, включають спектр з M1-подібними і M2-подібними фенотипами і можуть виявляти протипухлинну здатність (M1-подібний фенотип) або відповідальні за збільшення росту ракових клітин (M2-подібний фенотип). Більшість з них мають M2-подібний фенотип (CD163). У дослідженнях вважається, що BMP-2 в основному секретується клітинами мікрооточення пухлини, але не самих пухлинних клітин PГЗ.

Відомо, що ПАМ є важливим компонентом мікрооточення пухлини та здатні секретувати BMP-2, що сприяє до кальцифікації судин [84, 88].

Роль остеотропних маркерів у розвитку біомінеральних депозитів та раку грудної залози

Останнім часом багато уваги дослідників приділяється вивченню ролі протеїнів позаклітинного матриксу у регуляції процесу кісткової мінералізації. До них належать OPN, остеопротегерин (OPG), SPARC, RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) [89, 90, 91].

Протеїни позаклітинного матриксу експресуються на поверхні клітин різних типів, включаючи антигенпрезентуючі клітини (мононуклеари, макрофаги), преостеобласти/остеобласти, остецити, хондроцити, фібробласти, ендотеліальні клітини, гладком'язові клітини, а також у тканинах скелетних м'язів, молочних залоз, паренхіматозних органів та плаценті [91, 92].

OPN відіграє важливу роль у різних нормальних фізіологічних процесах, включаючи ремоделювання кісток, імунну регуляцію, запалення та васкуляризацію. Крім того, OPN бере участь у канцерогенезі з багатофункціональною діяльністю. Встановлено, що ізоформи OPN по-різному експресуються в багатьох типах пухлин і відіграють важливу роль на різних стадіях розвитку та прогресування раку. OPN може бути корисним біомаркером для моніторингу прогресування раку та одним із значущих предикторів поганого прогнозу та рівня виживання, при деяких видах раку, наприклад, при раку грудної залози та раку легенів [91, 92, 93, 94, 95].

Таким чином, OPN може мати кілька потенційних клінічних ключів: по-перше, як зручний інструмент для клінічного тестування. Як секретований білок, OPN можна виявити в рідинах організму, таких як кров, сеча та рідини порожнини тіла. По-друге, можливість поєднання OPN з іншими біомаркерами, такими як VEGF, ММП, забезпечує більш точні прогнози та потенційної відповіді на терапію [96, 97].

Tabar та співавтори досліджували можливу прогностичну роль кальцинатів при інвазивному РГЗ, а саме те, що наявність біомінералів у тканині ГЗ пов'язана з поганим прогнозом, більш високим ризиком смертності, схильністю до рецидиву та HER-2-позитивним статусом [98, 99, 100, 101].

OPG відноситься до рецепторів ФНО- α , який являється секреторним розчинним протеїном, який секретується остеобластами, остеогенними стромальними стовбуровими клітинами та активованими мононуклеарами. Основна його роль полягає у інгібуванні остеобластогенеза та резорбції кісткової тканини [100, 102, 103].

SPARC – це глікопротеїн, який входить до складу сімейства матриксно-клітинних цистеїнзмістових протеїнів, які експресуються у кістковій тканині та слизовій оболонці тонкої кишки. Основною функцією є підтримання остеобластогенеза, регуляція фіброза, репозиція позаклітинного матриксу [100, 102, 104, 104].

Роль мікрооточення у розвитку метастазування РГЗ

Мікрооточення пухлинних клітин (МПК) складається з різних типів клітин (фібробластів, адипоцитів, ендотеліальних та інфільтруючих імунних клітин), які на різних етапах прогресування клітинної прогресії захоплюють ракові клітини. Імунні клітини пухлинного мікрооточення за допомогою міжклітинних зв'язків можуть взаємодіяти з пухлинними клітинами впливаючи на їх ріст, еволюцію та сприяючи неоангіогенезу. В МПК важливу роль відіграють реактивні клітини стромы, які представлені сполучнотканинними клітинами, які розташовані під базальною пластиною, до них відносять: фібробласти, позаклітинний матрикс та імунні клітини. МПК регулюють процеси проліферації та зміни фенотипування клітин, саме такі зміни характеризують розвиток злоякісного процесу у тканинах, пухлинну прогресію, метастазування та резистентність до лікування [105, 106, 107, 108, 109].

Важливу роль у пухлинному мікрооточенні відіграють клітини стромы, а саме асоційовані з карциномою фібробласти (CAF) - група фібробластів, які сприяють канцерогенезу та поширенню метастазуванню, шляхом взаємодії з клітинами і розвитку неоангіогенезу. CAF походять із нормальних фібробластів стромального компоненту, а також з перицитів, фіброцитів, мезенхімальних клітин. Можуть секретувати судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), фактор росту фібробластів (FGF), фактор росту тромбоцитів (PGGF), які беруть участь у неоангіогенезі. CAF виділяють трансформальний фактор росту бета (TGF- β). Даний комплекс взаємодію з епітеліальним мезенхімальним переходом (ЕМП), саме за допомогою цієї взаємодії відбувається запуск процесу метастазування клітин та інгібування цитотоксичних Т-клітин та природних Т-клітин-кілерів [108, 109, 110, 111, 112, 113].

У дослідженнях J. Goldberg та інших вказано, що пухлини ГЗ утворюють імуносупресивне пухлинне середовище. Важливу роль у перебігу та лікуванні РГЗ грає рецепторний статус пухлинної тканини РГЗ, а саме експресія рецепторів до естрогену альфа (ER), прогестерону (PR) та HER 2 neu. Потрійний негативний РГЗ пов'язаний з виявленою інфільтрацією лімфоцитів та клінічної відповіді на імунну терапію, а РГЗ з позитивним гормональним рецептором навпаки має низьку інфільтрацією лімфоцитів на поверхні пухлини та мінімальну відповідь на імунне лікування [109, 114, 115, 116, 117].

Angela A. Araujo та інші описали взаємозв'язок між імунними клітинами, CAF, пухлинними клітинами та цитокином онкостатину М (OSM), саме така взаємодія сприяє прогресуванню та метастазуванню РГЗ. OSM відносять до сімейства ІІ-6, вважається гострофазовим медіатором запалення та виділяється активованими лейкоцитами. Роль цього цитокіна вважається основною у розвитку пухлиногенезу та метастазуванні. OSM індукує епітеліально-мезенхімальний перехід, що вважається початковою ланкою у прогресуванні пухлин. Висока експресія OSM у зразках тканин РГЗ корелює із зниженням виживаності у таких пацієнтів [118, 119, 120, 121].

Lauren E. Hillers-Ziemer та інші дослідники описали зв'язок ожиріння у жінок хворих на РГЗ з мікрооточенням пухлин та поганому прогнозу у розвитку захворювання та лікування. У жінок в постменопаузі найчастіше діагностують РГЗ, який експресує ER та PR рецептори і ризик діагностики цього типу раку корелює зі збільшенням індексом маси тіла (ІМТ). У жінок з ожирінням частіше розвивається рак з люмінальним молекулярним підтипом В, який характеризується підвищеною проліферацією та зниженою безрецидивною виживаністю. На швидке зростання пухлинної прогресії впливають зміни компліменту та функції адипоцитів, а також клітини, такі як стромальні клітини жирового походження, імунні та ендотеліальні клітини. Взаємодія цих клітин посилює секрецію цитокінів та адипокінів, а також локальний рівень естрогенів в мікрооточенні пухлин ГЗ, що сприяє резистентності до терапії. Дослідження показали, що зміни мікрооточення пухлини та навколишньої тканини ГЗ за

умов розвитку ожиріння, можуть сприяти поширенню метастазів, шляхом ініціювання CAFS у пухлинних клітинах, які за допомогою ЕМП експресують епітеліальні та мезенхімальні гени [110, 122, 123, 124, 125]. В основі метастазування пухлин лежить здатність пухлинних клітин взаємодіяти з ендогенними клітинами. Ці клітинні взаємодії активують стромальні клітини, перетворюючи їх на асоційовані з пухлиною фібробласти (TAFS) та адипоцити (ТАА), що викликає посилену експресію білків, таких як альфа-актин гладких м'язів (α -SMA) і матриксних металопротеїназ (ММР), що сприяє підвищенню інвазивності пухлини, а сигнальні шляхи TAF, такі як окислювальний стрес, аутофагія та гліколіз, сприяють розвитку мікрооточення та росту пухлинних клітин. Також гіпоксичне середовище пухлинної клітини призводить до ендотеліальної індукції ангиогенезу, що створює сприятливі умови для метастазування по кровоносним та лімфатичним судинам [110, 123, 126, 127, 128, 129, 130, 131]. Адипоцити, які після трансформації та експресії білків у поєднанні з вільними жирними кислотами (FAA) і ММР взаємодіють з імунними клітинами МПК та створюють середовище схоже на хронічне запалення, що підсилює утворення ЕМП та зміни фенотипу інвазивної пухлини ГЗ [130, 132, 133, 134, 135, 136].

Пухлинні клітини у мікрооточенні сприяють поляризації макрофагів у бік імуносупресивного підтипу M2. Змішана популяція макрофагів M1/M2, що утворюють асоційовані з пухлиною макрофаги (ТАМ), які призводять до експресії імуносупресивних цитокінів, сприяючи метастазуванню пухлин [130, 137, 138, 139, 140, 141].

1.3. Бібліометричний аналіз літератури про мікрокальцифікати раку грудної залози

Нами було проаналізовано наукові джерела бази даних Scopus, які включали 924 публікацій. Дані електронні джерела фільтрувались за ключовими словами «рак грудної залози», «кальцифікація». Результати

бібліометричного аналізу, свідчать про те, що кількість публікацій на зазначену тематику помітно зросла за останні 10 років, що вказує на актуальність проблеми та шляхи їх вирішення у науковців (рис. 1).

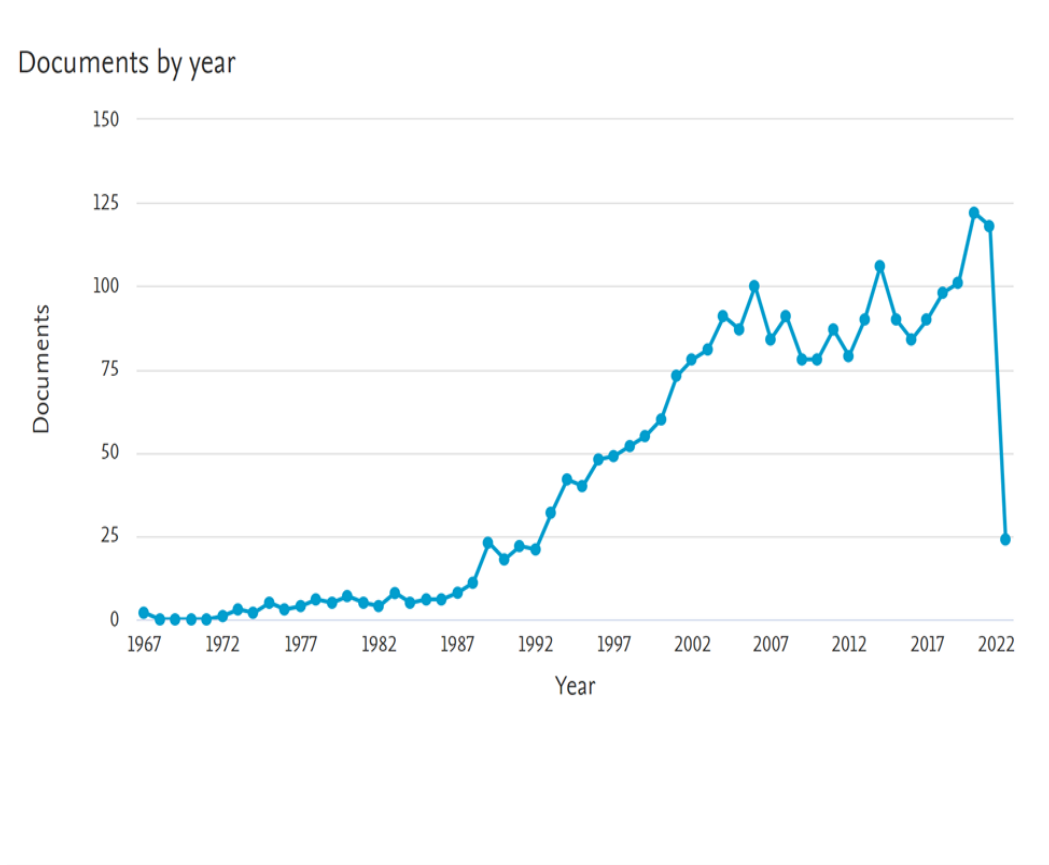


Рисунок 1.1 – Результат візуалізації хронології виходу публікацій за період 1967-2022 рр. із використанням інструментів бібліометричного аналізу бази даних Scopus

Проблему патологічної біомінералізації раку грудної залози активно вивчають вчені переважно з Сполучених Штатів Америки, Китаю та Великої Британії.

Дослідивши результатами бібліометричного аналізу 924 публікацій бази даних Scopus інструментами сервісу SciVal за ключовими словами «рак грудної залози», «кальцифікація» за період 1967-2022 рр., було встановлено, що переважна більшість належить до сфери медицини. Також у зазначеному полі можна виділити 27 тематичних кластери, більшість яких належить до сфери медицини, комп'ютерних наук, інженерії, матеріалознавства, фізики та

поодинокі – до галузі математичних наук. Серед найбільш цікавих напрямів публікаційної активності слід виділити роботи присвячені РГЗ, а саме: класифікації пухлин ГЗ, ранній діагностиці РГЗ, класифікація біомінеральних депозитів (рис.1.2).

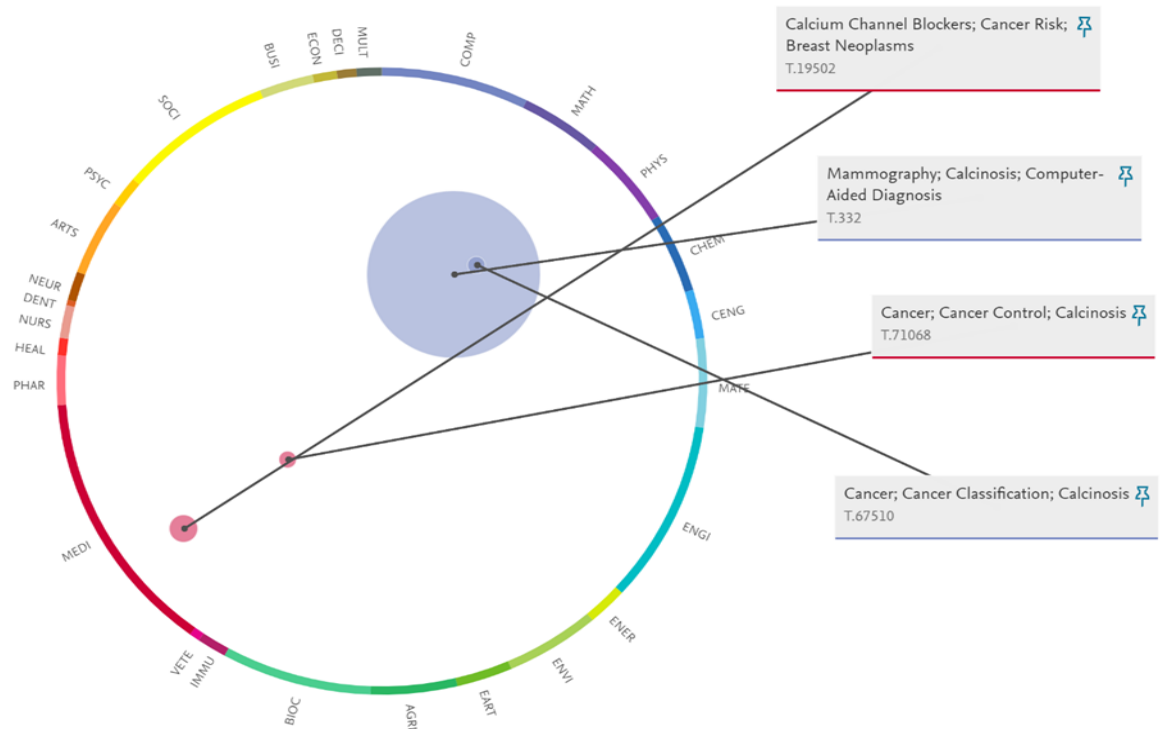


Рисунок 1.2 – Результат візуалізації розподілу публікацій за темами та кластерами із використанням інструментів бібліометричного аналізу SciVal

Також проаналізували публікаційну активність 1967-2022 рр. за досліджуваною темою використавши інструмент для побудови та візуалізації бібліометричних мереж VOSviewer. В результаті бібліометричного аналізу 924 публікацій у базі даних Scopus за ключовими словами «рак грудної залози», «кальцифікація» ми виділили 4 хронологічні етапи, які включають: 1) радіологічні методи дослідження – мамографія, дослідження за допомогою клінічних та гістологічних методів, 2) патоморфологічна оцінка РГЗ та кальцифікатів, 3) дослідження біомаркерів пухлинної прогресії РГЗ, 4) прогностична оцінка РГЗ в залежності від метастзування та виживанності (рис. 1.3). Також розподілили дані публікації на 6 тематичних кластерів: 1) класифікація біомінералів, 2) мамографія, 3) фізико-хімічний склад

Рисунок 1.4 – Результат візуалізації тематичного розподілу патологічної біомінералізації раку грудної залози із використанням інструментів бібліометричного аналізу VOSviewer

Використавши інструмент для побудови та візуалізації бібліометричних мереж VOSviewer публікаційної активності за період 1967-2022 рр за досліджуваною тематикою результатів бібліометричного аналізу 924 публікацій у базі даних Scopus за ключовими словами «рак грудної залози», «кальцифікація» ми виділили 4 хронологічні етапи, які включають: 1) радіологічні методи дослідження - мамографія дослідження за допомогою клінічних та гістологічних методів, 2) патоморфологічна оцінка РГЗ та кальцифікатів, 3) дослідження біомаркерів пухлинної прогресії РГЗ, 4) прогностична оцінка РГЗ в залежності від метастазування та виживанності, а також дані публікації на 6 тематичних кластерів: 1) класифікація біомінералів, 2) мамографія, 3) фізико-хімічний склад кальцифікатів, 3) протокова неоплазія грудної залози, 4) біопсія, 5) метастазування РГЗ, 6) гідроксиапатит кальцію.

Враховуючи ці дані, можна казати про те, що увага науковців в останній час приділяється вивченню та розробці аспектів ранньої діагностики раку грудної залози, а також факторів, які впливають на погіршення прогностичних критеріїв, таких як виживаність та метастазування у таких пацієнток, що пов'язане з утворенням біомінеральних депозитів у тканині ГЗ. Тому вивчення та запровадження нових методів діагностики та оцінки патоморфологічних характеристик РГЗ та кальцифікатів є пріоритетним на даний час та потребує багато уваги та зацікавленості.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[208]

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дисертаційна робота виконана в Сумському державному університеті на кафедрі патологічної анатомії.

Протокол комісії етики. Дослідження схвалено етичним комітетом Медичного інституту СумДУ (протокол № 8/12 від 08.12.2022 р.). Усі дослідження виконані згідно з Гельсинською декларацією (6-те видання, перегляд 2008 р., м. Сеул) та Універсальною декларацією біоетики та прав людини (2006 р.).

Зразки пухлин тканини ГЗ

Дослідження проводилось на матеріалі, отриманому під час хірургічних операцій на базі Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру (СОКОД). При проведенні ретроспективного аналізу було вивчено 469 випадків пункційних біопсій інвазивного раку грудної залози. Пункційні біопсії досліджені на предмет імуногістохімічної експресії рецепторів ER, PR, Her2-neu та наявності мікрокальцифікатів. Після гістологічного дослідження були відібрані 30 зразків тканини раку грудної залози (група I), з наявністю мікрокальцифікатів. У якості контролю були використані 30 зразків тканини раку грудної залози без ознак біомінералізації (група II). Було проаналізовано клінічні дані та проведений розподіл досліджуваних зразків за класифікацією TNM, що дозволило оцінити ступінь поширення пухлини, метастазування до регіонарних лімфатичних вузлів та розвитку віддалених метастазів (табл. 2.1).

Таблиця 2.1 – Розподіл досліджуваних зразків РГЗ I та II групи за клінічною класифікацією TNM.

<i>Клінічна стадія</i>		<i>I група</i> <i>n = 30</i>	<i>II група</i> <i>N = 30</i>
<i>Показник T</i>	T ₁	3	9
	T ₂	27	19
	T ₃	0	0
	T ₄	0	2
<i>Показник N</i>	N ₀	15	16
	N ₁	14	14
	N ₂	1	0
<i>Показник M</i>	M ₀	30	30
	M ₁	0	0

Гістологічний та гістохімічний методи

Зразки тканини пухлин ГЗ фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну впродовж 24 годин. Виготовлення парафінових блоків здійснили за загальноприйнятою методикою. Парафінові серійні зрізи блоків товщиною 4–5 мкм готували за допомогою ротаційного мікротома Shandon Finnesse 325 (Thermo Scientific, США). Потім підготовлені депарафінізовані зрізи забарвлювали гематоксилином та еозином згідно загальноприйнятої методики.

Гістохімічні забарвлення зразків пухлинної тканини для виявлення сполук кальцію виконували за допомогою барвника алізаринового червоного S та методом фон Косса.

При проведенні мікроскопічного дослідження враховували такі характеристики РГЗ: гістологічний тип будови, тип кальцифікації.

Імуногістохімічне дослідження тканини РГЗ

Серійні зрізи товщиною 4 мкм наносили на клейкі слайди SuperFrost (Thermo Scientific, Waltham, MA, США). Депарафіновані зрізи піддавали обробці демаскування антигену термообробкою в 0,1 М цитратному буфері (рН 6,0) при 95–98 °С. Система імуногістохімічної візуалізації «UltraVision HRP Polymer» (Thermo Scientific, Waltham, США) використовували для візуалізації ІНС. Активність ендогенної пероксидази була заблокована 3% перекис водню. «Ultra V Block» використовувався для запобігання неспецифічних реакцій.

Реакцію посилювали за допомогою «Primary Antibody Amplifier Quanto», як хромоген використовували діамінобензидин (DAB). Ядра контрастно забарвлювали розчином гематоксилін Майєра. Використовували первинні антитіла проти остеопонтину (OPN) (Abcam, ab-8448, розведення 1:300), OPG, SPARC, RANKL, CD163, CD 68. Для кожного зразка аналізували 6 різних полів зору (FOV) діаметром 1 мм.

Таблиця 2.2 – Панель антитіл для ІГХ дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Розведення	Локалізація в клітині
OPN	Кролик	1:300	Цитоплазма
SPARC	Кролик	1:300	Цитоплазма
OPG	Кролик	1:300	Цитоплазма
RANKL	Миша	1:300	Цитоплазма
CD 68	Миша	1:200	Цитоплазма
CD 163	Кролик	Готовий до використання	Цитоплазма

Сканувальна та просвічувальна електронна мікроскопія

Гістологічні зрізи з парафінових блоків препаратів завтовшки 7-10 мкм розміщували на графітових предметних столиках. Препарати витримували 30 хв у термостаті при температурі 60°C. Після цього парафінові зрізи тричі покривали ксилолом по 5 хв, потім тричі покривали 96% етанолом по 5 хв, споліскували дистильованою водою [210]. Виготовлені препарати

досліджували на скануючому мікроскопі Inspect S50 з енергодисперсивним рентгенівським спектроскопом (Oxford Instruments, UK).

Просвічуюча електронна мікроскопія (TEM)

Просвічуючу електронну мікроскопію (TEM) з електронною дифракцією (ЕД) проводили на TEM-125K (SELMІ, Україна). Таким чином досліджено фазовий склад кальцинованих частинок та їх морфологічну структуру. Порошок мінералізованої тканини обробили ультразвуком у дистильованій воді з УЗДН-А (SELMІ, Україна). Питома потужність становила 15-20 Вт/см² при частоті випромінювача 22 кГц. Суспензію (кілька крапель) наносили на вертикально спрямований вгору ультразвуковий випромінювач УЗДН-А і розпилювали протягом 2-3 секунд при оптимальній потужності. Розпилений аерозоль монтували на тонкій вуглецевій підкладці (15-25 нм) на мідній сітці тримача зразка. ЕД зображення та мікрофотографії були зроблені при прискорювальній напрузі $U(\text{accelerate}) = 90$ кВ.

Фізико-хімічні методи дослідження

Вивчення біомінералів за допомогою методів прикладного матеріалознавства було проведене в лабораторії Інституту прикладної фізики НАН України (завідувач – канд. фіз.-мат. наук С. М. Данильченко).

Мінеральну складову відокремлювали від м'яких тканин депозиту шляхом термічного оброблення в електропечі (на повітрі) за t 200 °С впродовж 1 години. Відбувалося руйнування органічної частини депозиту і видалення вільної води при збереженні незміненої структури мінералу. Після такого низькотемпературного відпалювання здебільшого тверді частинки мінералу можна було легко відокремити механічно від золи органічних тканин. Також проводили оброблення матеріалу за t 900 °С впродовж 1 години, що дозволяло повністю розділити органічну та неорганічну фази біомінералів.

Рентгенодифракційне дослідження (XRD) структури матеріалів виконане на дифрактометрі ДРОН4-07 з використанням випромінювання $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154$ нм) за умов фокусування за Бреггом – Brentano ($\theta-2\theta$) (2θ – бреггівський кут). Зразки знімали в режимі безперервної реєстрації (швидкість $2\theta/\text{хв}$) в діапазоні кутів 2° від 10° до 70° . Обробка результатів була проведена в програмному пакеті DIFWIN-1 (ТОВ «Еталон ВТЦ»), ідентифікація кристалічної структури і фазового складу – за допомогою програмного пакета Crystallographica Search-Match (Oxford Cryosystems).

Статистичний аналіз

Результати морфометрії вимірювальних зрізків та дані ІГХ-дослідження були перевірені на нормальність за допомогою критеріїв Шапіро-Вілка. Якщо вибірки даних мали правильний розподіл, їх порівнювали за допомогою параметричного t-критерію Стюдента за умови підтвердження випадковості розбіжностей ($F_{\text{крит}} > F_{\text{експ}}$) згідно з критерієм Фішера. Якщо $t_{\text{експ}} \geq t_{\text{крит}}$, то відмінність вважали достовірною.

У разі ненормального розподілу цифрових показників для оцінювання статистичної значущості використовували критерій Манна – Уїтні.

Результати вважалися статистично значущими з вірогідністю понад 95 % ($p < 0,05$). Статистичну обробку проводили в Microsoft Office Excel 2016 з додатком AtteStat (версія 12.0.5). Усі графіки були зроблені за допомогою GraphPad Prism 9.0.

РОЗДІЛ 3

ЕПІДЕМІОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ В УКРАЇНІ ТА СУМСЬКІЙ ОБЛАСТІ ЗА 2015-2020 РОКИ

Для встановлення особливостей епідеміології РГЗ в Україні та Сумській області було проведено аналіз даних Національного канцер-реєстру України на це захворювання за 2015-2020 роки. Для розрахунку та обробки даних використовувались статистичні методи, такі як: Me – медіана, X_c – середній показник захворюваності, σ – стандартне відхилення та μ – середня похибка (таб. 1).

Таблиця 3.1. – Рівень захворюваності на рак грудної залози в Україні та Сумській області за 2015-2020 роки

	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Me	X_c	σ	μ
Україна	73,80	74,40	74,70	77,50	77,10	67,10	74,55	74,10	3,74	1,53
Сумська область	79,20	84,50	77,50	80,80	87,20	68,50	80,0	79,62	6,50	2,65

Примітки: Me – медіана; X_c – середній показник захворюваності за 2015-2020 роки; σ – стандартне відхилення; μ – середня похибка.

Враховуючи дані Національного канцер-реєстру України, середнє значення захворюваності на РГЗ за 2015-2020 роки складає $74,10 \pm 1,53$ випадків по Україні та $79,62 \pm 2,65$ випадків по Сумській області на 100 тис. жіночого населення.

Найвищі показники захворюваності на РГЗ в Україні спостерігаються у 2018 (77,5 випадків на 100 тис. жіночого населення), а найнижчі у 2020 році (67,1 випадків на 100 тис. жіночого населення). Стосовно Сумської області, то найвищий рівень захворюваності на рак грудної залози прослідковується у 2019 році (87,20 випадків на 100 тис. жіночого населення), а найнижчий - у 2020 році (68,5 випадків на 100 тис. жіночого населення) (рис.1).

Проаналізувавши дані захворюваності на РГЗ в Україні та Сумській області за 2015-2020 роки, можна відмітити високий рівень захворюваності у

Сумській області, який перевищує загальнодержавний рівень. Високий рівень захворюваності на РГЗ у Сумській області свідчить про важливість ранньої діагностики новоутворень грудної залози. Цікаво, що у період 2020 року чітко прослідковується тенденція до зниження захворюваності на РГЗ як у Сумській області, так і по всій Україні. Більшість дослідників пов'язує цей феномен з початком пандемії COVID-19.

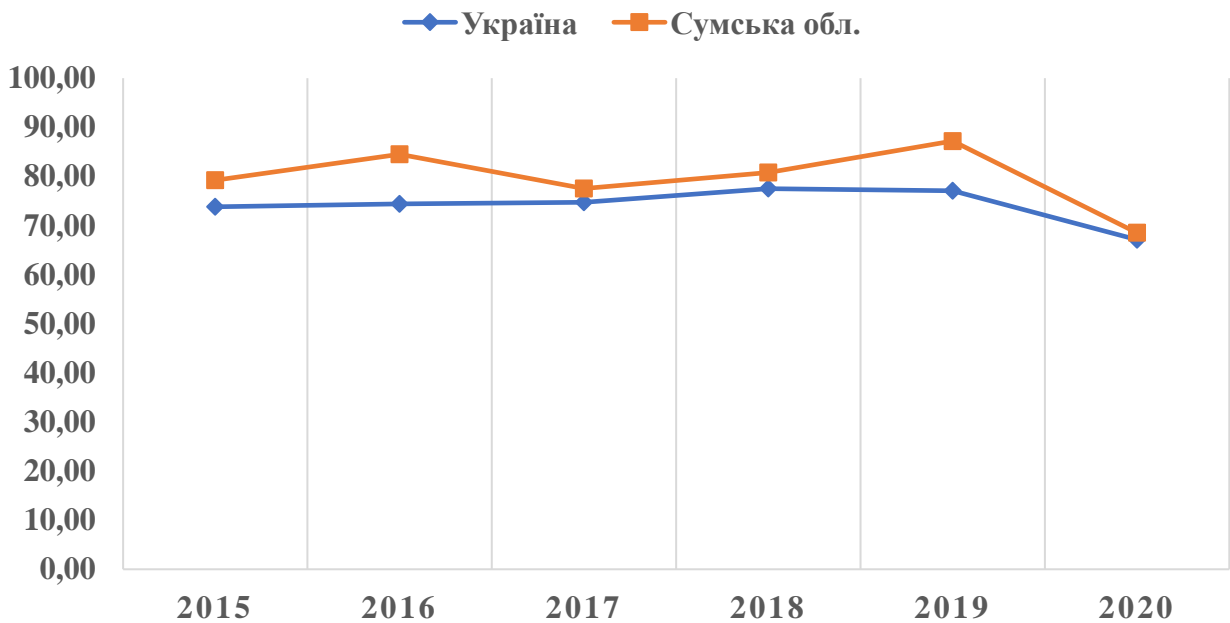


Рисунок 3.1.1 – Рівень захворюваності на рак грудної залози в Україні та Сумській області за 2015-2020 роки.

Примітки: вісь ординат – звичайний показник захворюваності на 100 тис. жіночого населення, вісь абсцис – роки.

Проаналізувавши дані розподілу РГЗ за віковими показниками у період 2015-2020 роки, встановлено що найвищі показники фіксуються у 60-64 роки ($160 \pm 3,87$ випадків на 100 тис. жіночого населення), 55-59 років ($133,51 \pm 4,19$), 50-54 років ($109,97 \pm 2,06$) та 40-44 років ($75,79 \pm 1,21$). Пікові значення поширеності захворювання на РГЗ спостерігаються у 70-74 років ($168,29 \pm 7,59$ випадків на 100 тис. жіночого населення), натомість РГЗ значно рідше реєструється у віці 35-39 років ($43,2 \pm 0,86$), 30-34 років ($20,42 \pm 0,35$), ще рідше у віці 25-29 ($7,08 \pm 0,19$). Поодинокі випадки фіксуються у 20-24 роки ($1,37 \pm 0,08$) та в 15-19 років ($0,2 \pm 0,12$) (рис. 3.1.2).

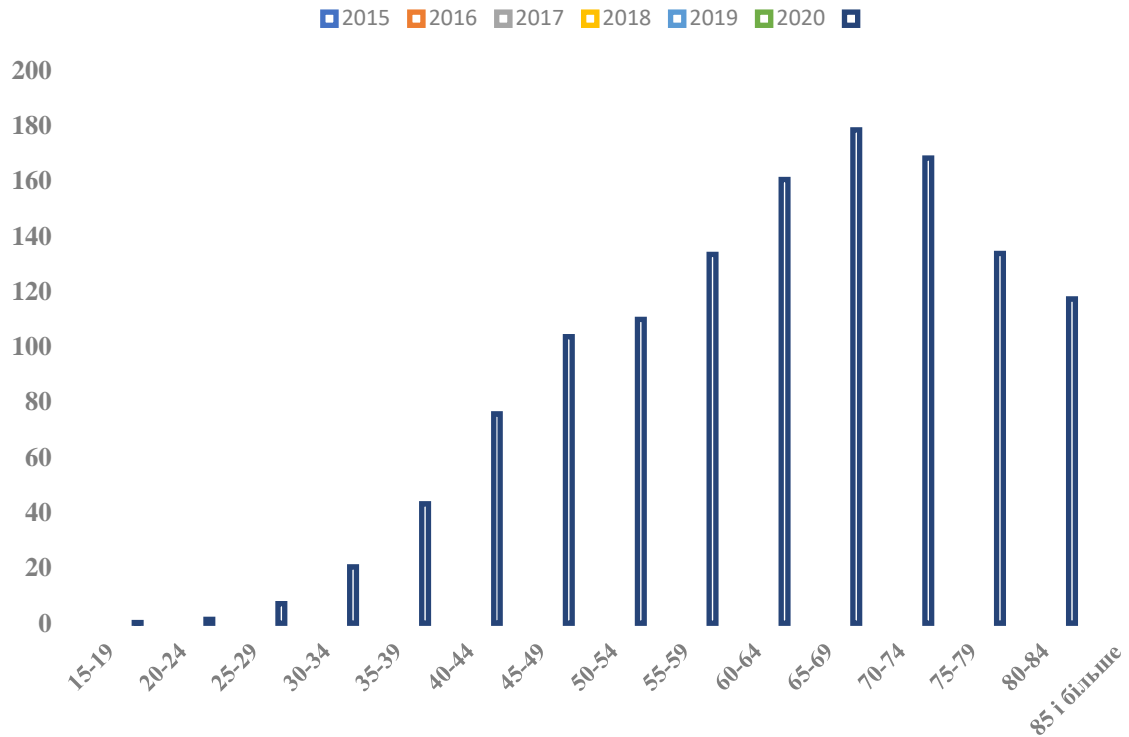


Рисунок 3.1.2 – Розподіл жінок хворих на рак грудної залози за віковими періодами протягом 2015-2020 років (на 100 тис. жіночого населення)

За результатами дослідження розподілу поширеності РГЗ в Україні за областями (на 100 тис. жіночого населення) у період 2015-2020 років найбільша кількість випадків реєструється у м. Київ, Кіровоградській, Запорізькій, Сумській, Харківській та Херсонській областях, а найменші рівні показників захворюваності у Чернівецькій, Тернопільській, Рівненській, Івано-Франківській та Закарпатській областях (рис. 3.1.3), що може бути пов'язано з рівнем діагностики та екологічною ситуацією середовища.

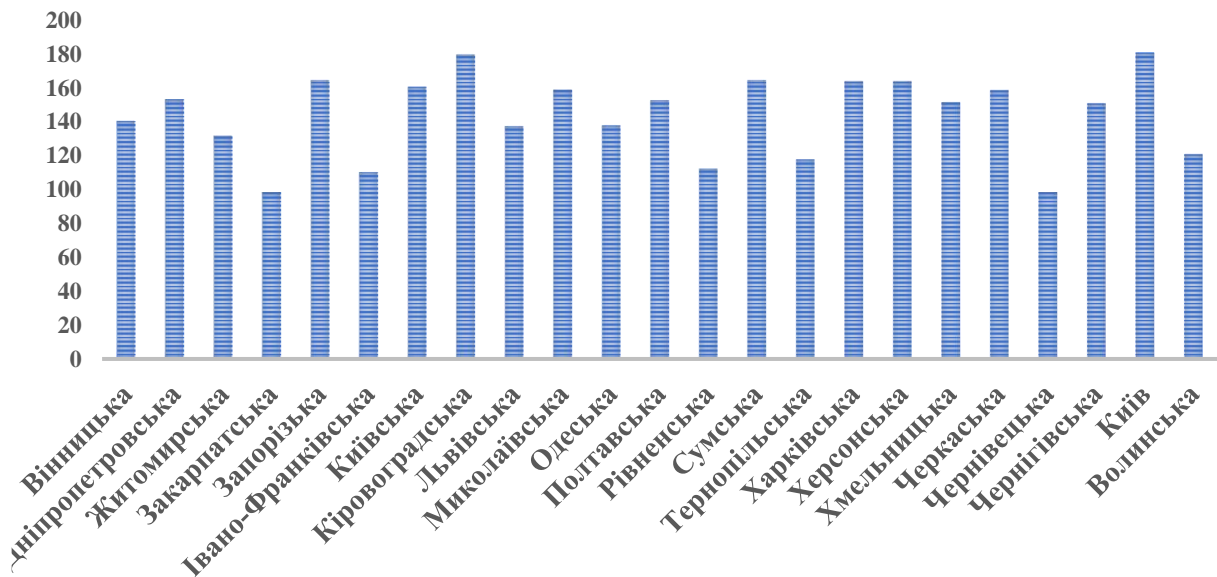


Рисунок 3.1.3 – Розподіл показників захворюваності на рак грудної залози в областях України протягом 2015-2020 років (на 100 тис. жіночого населення)

Також нами було проведено аналіз стадійного розподілу РГЗ серед випадків захворюваності в Україні та Сумській області, які були вперше виявлені за 2015-2020 роки. Аналіз даних показав, що встановлення стадії захворювання у жінок, які вперше звернулися складала для I-II стадії – 62,6%, III стадії – 14,7%, IV стадії – 8,4% та в 2% - стадію не було визначено по Україні, та для I-II стадії – 72,7%, III стадії – 4,78%, IV стадії – 3,8% та в 4,77% - стадію не було визначено для Сумської області (рис. 3.1.4). Враховуючі ці дані, ми бачимо, що частіше встановлення стадії захворювання приходить на I-II стадію, як в Україні, так і в Сумській області, що вказує на важність діагностики РГЗ на перших стадіях, так як рання діагностика, яка базується на пальпації, УЗД та мамографічному дослідженні грудної залози може бути ключовим та важливим етапом на моменті раннього виявлення захворюваності та попередження розвитку поширення процесу у менш

тривалий термін, розвитку метастазуванню та підвищення показників рівня п'ятирічної виживаності у жінок з даною патологією.

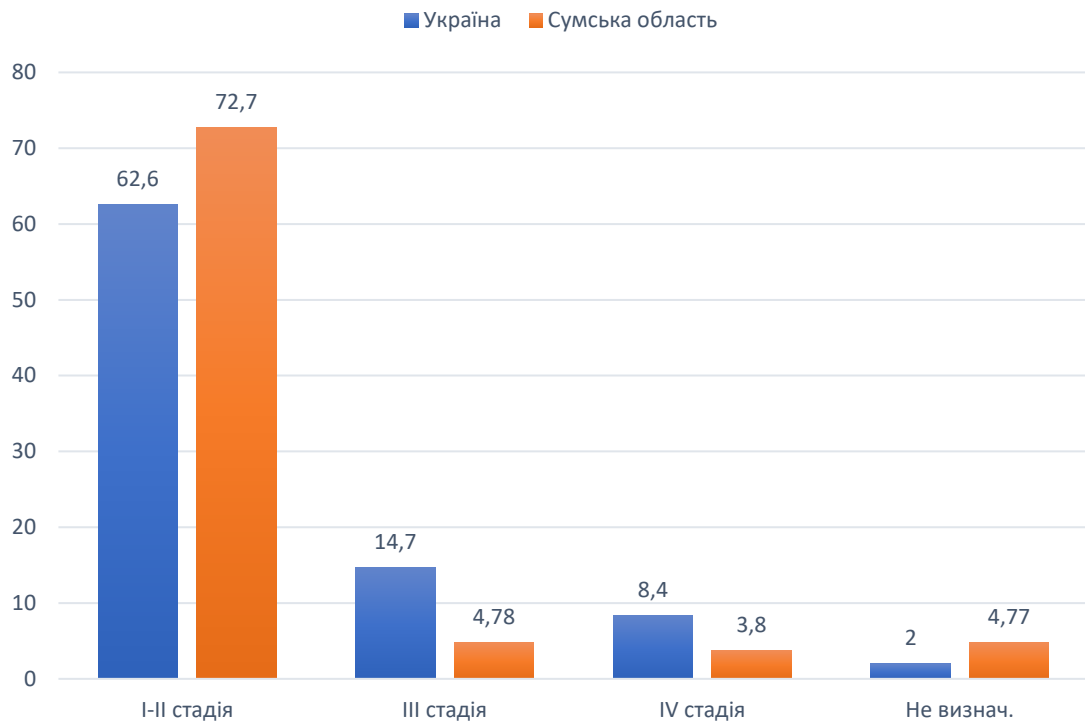


Рисунок 3.1.4 – Порівняння стадій раку грудної залози в Україні та Сумській області, які були вперше виявлені за 2015-2020 роки, питома вага загальної кількості хворих

На основі статистичного аналізу даних захворюваності на РГЗ за 2015-2020 роки ми знайшли закономірність, яка вказує, що рівень захворюваності у Сумській області перевищує загальнодержавний рівень та має високі показники.

Пікові показники захворювання на РГЗ спостерігаються у 70-74 років ($168,29 \pm 7,59$ випадків на 100 тис. жіночого населення), високі показники реєструються у 60-64 роки ($160 \pm 3,87$ випадків на 100 тис. жіночого населення), 55-59 років ($133,51 \pm 4,19$), 50-54 років ($109,97 \pm 2,06$) та 40-44 років ($75,79 \pm 1,21$). Найрідше захворювання виявляють у 30-34 років ($20,42 \pm 0,35$), ще рідше у віці 25-29 ($7,08 \pm 0,19$). Поодинокі випадки фіксуються у 20-24 роки ($1,37 \pm 0,08$) та в 15-19 років ($0,2 \pm 0,12$). Ці дані не виключають той

факт, що у будь-якому віці дуже важлива рання діагностика та обстеження грудної залози згідно стандартів, задля раннього виявлення та профілактики даної нозології.

Щодо поширеності РГЗ в Україні за областями (на 100 тис. жіночого населення) у період 2015-2020 років, то ми виділили, що все таки найбільша кількість випадків реєструється у м. Київ, Кіровоградській, Запорізькій, Сумській, Харківській та Херсонській областях, а найменші рівні показників захворюваності спостерігаються у Чернівецькій, Тернопільській, Рівненській, Івано-Франківській та Закарпатській областях.

Найчастіше РГЗ діагностується на I-II стадіях, як в Україні, так і у Сумській області. Були проаналізовані показники Сумського обласного канцер-реєстру та відділу статистики Сумського обласного клінічного онкологічного диспансеру за період з 2015 по 2020 роки.

Рівень захворюваності на РГЗ серед районів Сумської області за 2015-2020 роки на 100 тис. населення суттєво відрізняється в залежності від району, на що можуть впливати ряд факторів, таких як: екологічний стан навколишнього середовища, вікова структура населення певного району та рівень ранньої діагностики у закладах охорони здоров'я. При оцінці рівня захворюваності враховувались показники: \bar{X}_c – середній показник захворюваності за 2015-2020 роки; σ – стандартне відхилення та μ – середня похибка (табл.1).

До найвищих показників захворюваності на РГЗ серед районів Сумської області належать м. Суми ($81,62 \pm 10,71$), Путивльський ($79,35 \pm 16,76$) та Роменський ($78,52 \pm 11,46$). Найнижчий рівень захворюваності був у Липоводолинському ($50,4 \pm 4,3$), Серединобудському ($46,83 \pm 10,32$) та Білопільському ($41,93 \pm 11,31$) районах (табл. 2).

Таблиця 3.2 – Рівень захворюваності на рак грудної залози у районах Сумської області протягом 2015-2020 років на 100 тис. населення

Район	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Xс	σ	m
Білопільський	18,2	51,7	93,3	22,7	34,5	31,2	41,93	27,7	11,31
Буринський	50,8	67	98,4	38,7	79,7	73,8	68,07	21,21	8,66
В. –Писарівський	9,5	106,5	88,6	50,4	51,9	85,7	65,43	43,14	14,34
Глухівський	12,7	84	71,9	63	77,5	51,4	60,08	25,86	10,56
Конотопський	28,8	70,4	54	70,1	83,4	47,8	59,08	19,55	7,98
Краснопільський	32,6	92,5	66,7	40,6	110,6	49,4	65,4	30,74	12,55
Кролевецький	43	106,1	48,8	74	50,2	71,5	65,6	23,56	9,62
Лебединський	43,3	67,8	76,5	65,2	41,4	67,5	60,28	14,43	5,89
Л. – Долинський	68,3	59,4	60,3	30,6	52	31,8	50,4	15,75	6,43
Недригайлівський	29,8	75,5	38,3	77,9	103,4	65	64,98	27,21	11,11
Охтирський	27,3	79,8	52,6	63,1	117,2	59,2	66,53	30,14	12,3
Путівльський	72,4	53,4	155,3	82,5	77	35,5	79,35	41,06	16,76
Роменський	24,9	78,7	76,8	101,3	97,8	91,6	78,52	28,07	11,46
С.– Будський	22,4	34,1	46,2	82	23,7	72,6	46,83	25,28	10,32
Сумський	36,2	66,2	62,8	78,2	54,6	51,9	58,32	14,29	5,84
Тростянецький	10,3	89,6	79,8	75,3	92,9	88,7	72,77	31,31	12,78
Шосткинський	29,2	86,5	76	91,8	81,7	59,7	70,82	23,18	9,46
Ямпільський	45,2	61,1	54,2	102,1	48	57	61,27	20,83	8,5
м. Суми	30,9	97,9	86,4	95,7	100,9	77,9	81,62	26,25	10,71

Примітки: Xс – середній показник захворюваності за 2015-2020 роки; σ – стандартне відхилення; μ- середня похибка.

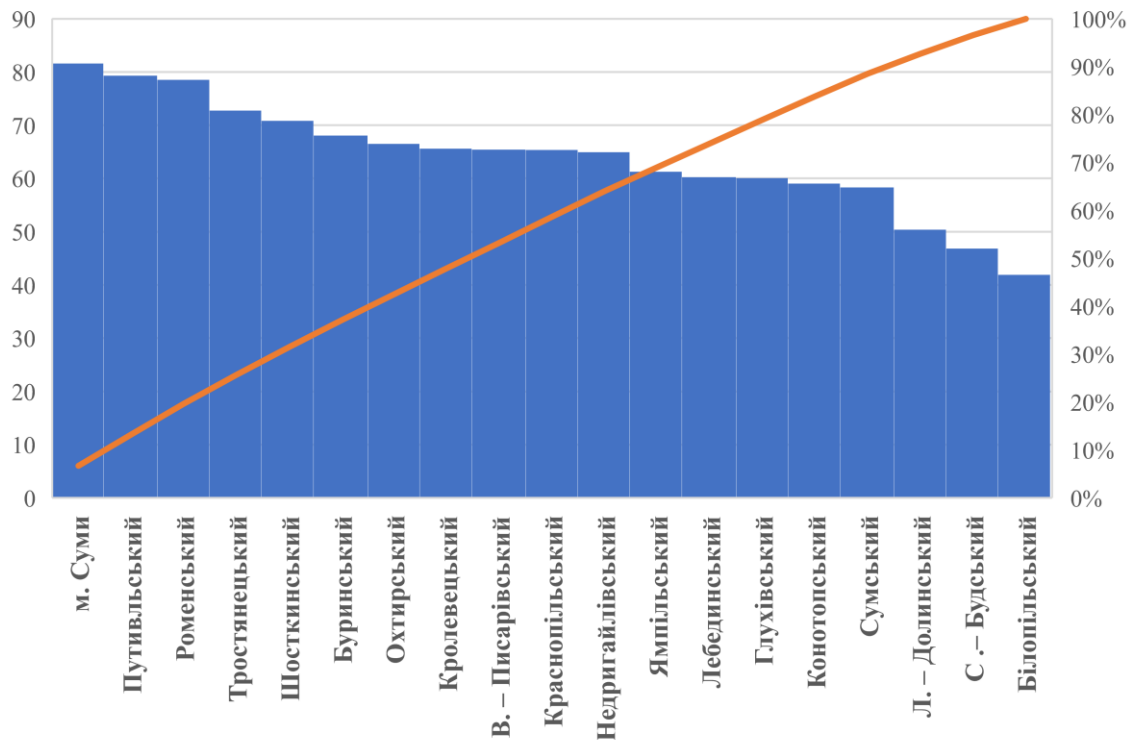


Рисунок 3.1.5 – Рівень захворюваності на рак грудної залози у районах Сумської області протягом 2015-2020 років на 100 тис. жіночого населення (дані представлені за спаданням показників)

Також були проаналізовані показники питомої ваги випадків на РГЗ у районах Сумської області виявлених на профоглядах, серед загального числа захворівших (%), враховувались показники: X_c – середній показник захворюваності виявлених на профоглядах за 2015-2020 роки; σ – стандартне відхилення та μ - середня похибка.

До районів з високими показниками захворюваності на РГЗ виявлених на профоглядах відносились Липоводолинський ($71,5 \pm 9,4$), Конотопський ($62,1 \pm 6,0$) та Роменський ($69,0 \pm 4,1$). Натомість найнижчий рівень захворюваності на РГЗ виявлених на профоглядах характеризувався в Охтирському районі ($41,8 \pm 3,9$) (рис 3.1.6).

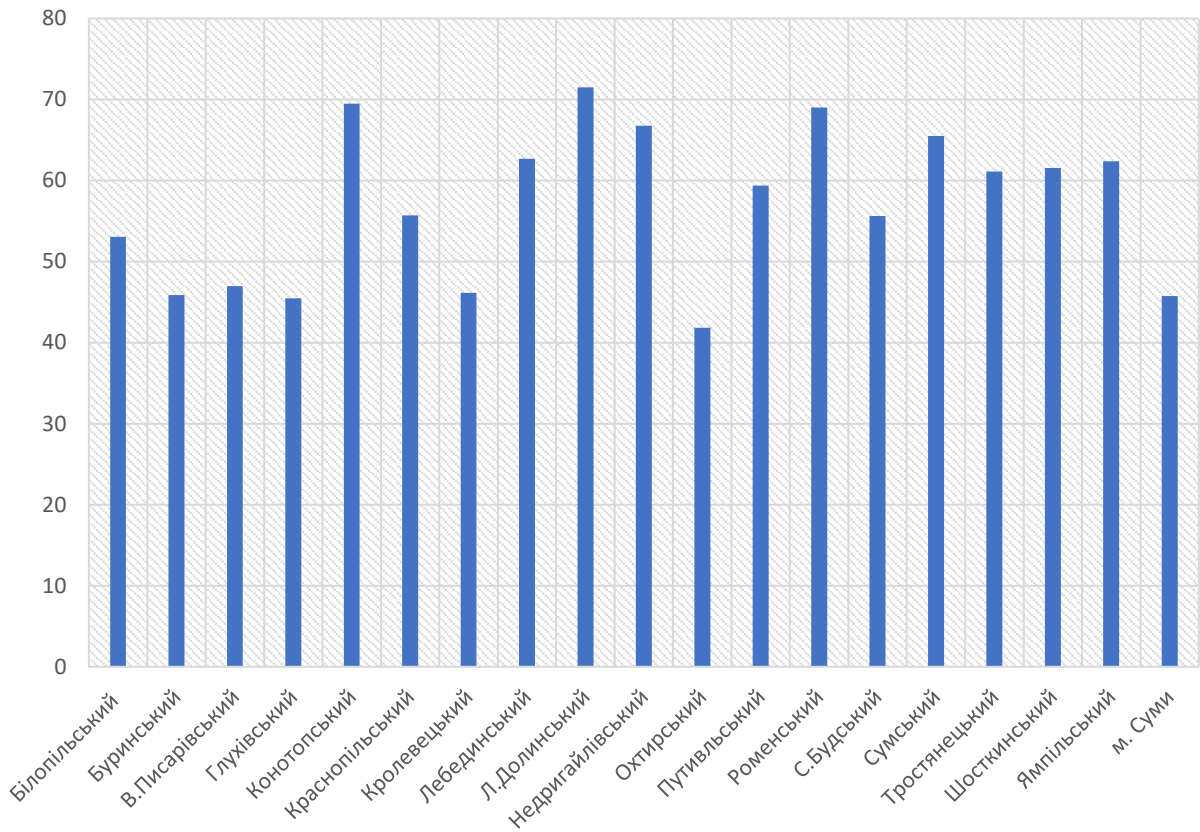


Рисунок 3.1.6 – Рівень захворюваності на рак грудної залози у районах Сумської області виявлених на профоглядах, серед загального числа захворівших протягом 2015-2020 років (на 100 тис. жіночого населення)

Проаналізувавши дані питомої ваги онкохворих на РГЗ у районах Сумської області, які прожили 5 та більше років після встановлення діагнозу за 2015-2020 роки, можна виділити райони з найвищими показниками - Буринський ($70,9 \pm 1,0$), Липоводолинський ($66,9 \pm 1,2$) та Середнобудський ($66,6 \pm 1,3$), інші райони характеризувались середніми показниками (рис.3.1.7).

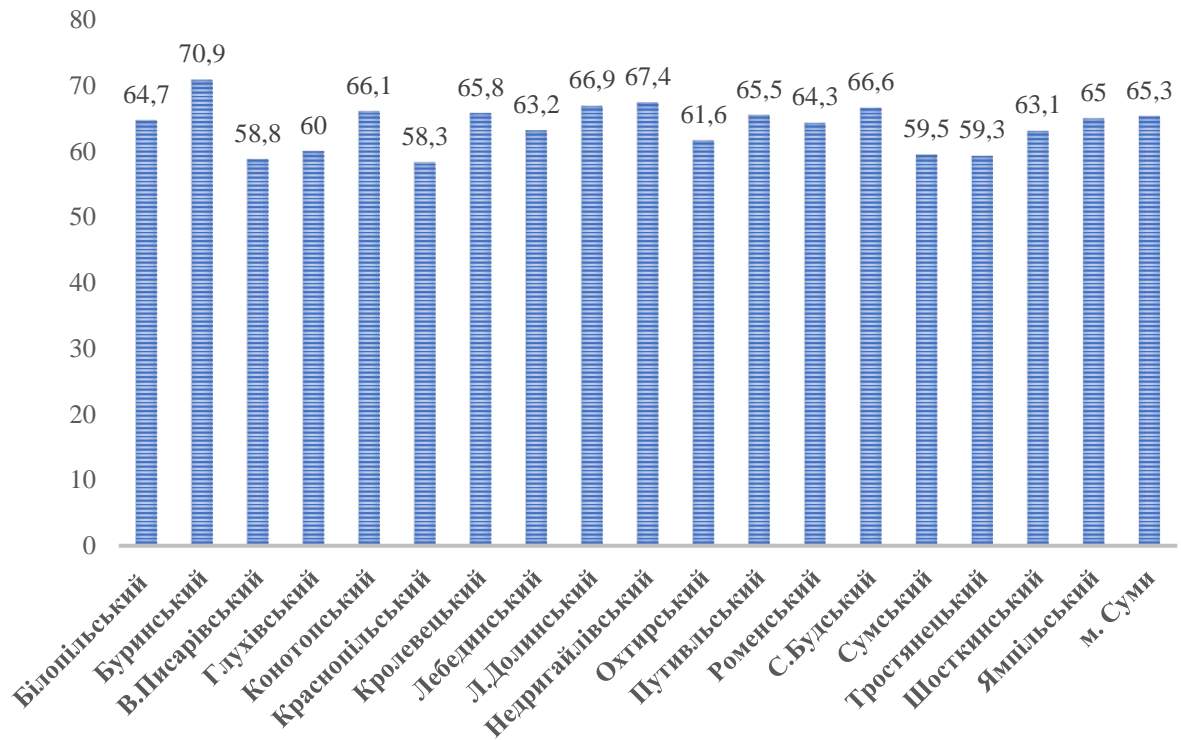


Рисунок 3.1.7 – Рівень виживаності хворих (5 та більше років) на рак грудної залози у районах Сумської області після встановлення діагнозу за 2015-2020 роки (на 100 тис. жіночого населення)

На високі та середні показники виживаності у хворих на РГЗ у Сумській області впливають ряд факторів, один з яких встановлення діагнозу частіше на I-II стадіях.

Отже, рання діагностика РГЗ важлива для попередження розвитку ускладнень, таких як метастазування у віддалені органи та лімфатичні вузли, що в цілому впливає на виживаність у таких хворих. Тому впровадження нових методів ранньої діагностики РГЗ є актуальною задачею серед науковців у наш час. Розробка та впровадження новітніх методів може покращити епідеміологічну ситуацію на РГЗ не тільки в Сумській області, але і в Україні, адже ця проблема є ключовою для нашої країни.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях: [209]

РОЗДІЛ 4

РЕТРОСПЕКТИВНИЙ АНАЛІЗ ВПЛИВУ МІКРОКАЛЬЦИФІКАТІВ НА ЕКСПРЕСІЮ ER, PR ТА HER2-NEU

Ми провели ретроспективний аналіз 469 випадків пункційних біопсій інвазивного раку грудної залози, які були взяті з архіву Наукового Центру патоморфологічних досліджень кафедри патологічної анатомії СумДУ за період 2014-2019 років. Пункційні біопсії досліджені на предмет імуногістохімічної експресії рецепторів Ер, Пр, Her2-neu та наявності мікрокальцифікатів. Препарати з ознаками кальцифікації були об'єднані до групи IA, усі інші препарати віднесли до групи IB. З 469 досліджуваних зразків тканини РГЗ, у 55 випадках (група IA) були виявлені мікрокальцифікати. Групу IB склали 414 біоптатів ГЗ без ознак патологічної біомінералізації. Розподіл зразків раку грудної залози здійснювався на основі гістологічного дослідження (верифікації).

Метою проведення ретроспективного дослідження було встановлення впливу кальцифікатів на рівень експресії рутинних діагностичних маркерів, які завжди використовуються у процесі діагностики і лікування пацієток з РГЗ. Зазначена інформація також дозволить непрямо оцінити про зв'язок процесів патологічної біомінералізації та гормональною активністю тканин.

Експресія рецепторів естрогенів проявлялася позитивним ядерним забарвленням пухлинних клітин достатньої інтенсивності. Традиційно рівень експресії цих рецепторів визначався через встановлення процентного співвідношення кількості позитивно забарвлених ядер до незабарвлених ядер пухлинних клітин у полі зору. У групі IA процент забарвлених ядер у середньому складав $52,45 \pm 5,3 \%$, що відповідало помірному рівню експресії рецепторів естрогену. Близька локалізація мікрокальцифікатів до пухлинних клітин не призводить до зміни експресії рецепторів естрогену, за винятком випадків утворення некрозів тканини або локалізації мікрокальцифікату всередині проток - так званих «комедо»-некрозів (рис. 3.2.1).

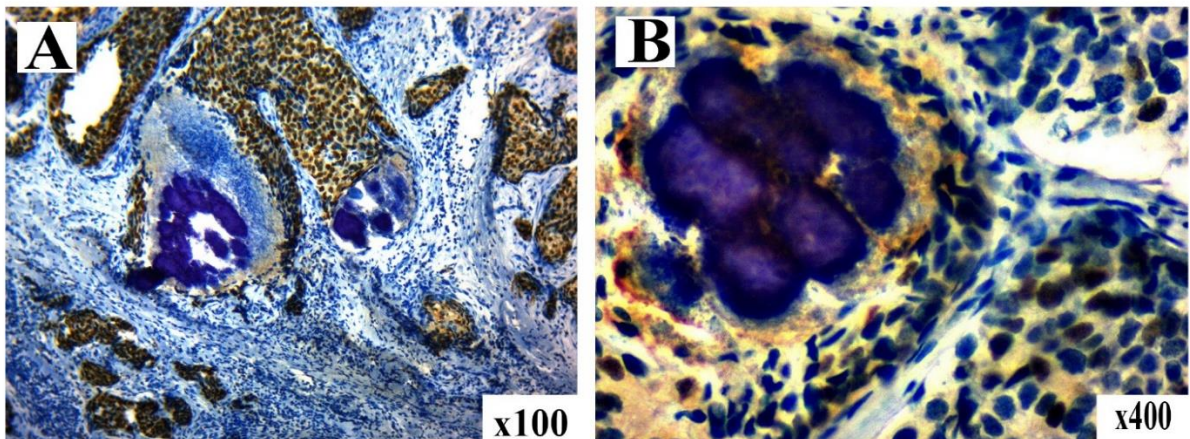


Рисунок 4.1 – Ретроспективне імуногістохімічне дослідження експресії естрогену у зразках РГЗ групи ІА. Контрастування ядер гематоксином Майера. А, В – збільшення вказане у правому нижньому куті кожного зображення.

Експресія рецепторів прогестерону також має ядерну локалізацію і у всіх випадках має нижчий рівень за експресію естрогенів. Рівень експресії рецепторів прогестерону в групі ІА у середньому складав $27,36 \pm 4,08\%$, що відповідало низькому рівню експресії гормону. У частині випадків рецептори прогестерону виявляли більш слабку експресію у місцях локалізації мікрокальцифікатів (рис. 3.2.2 А, В).

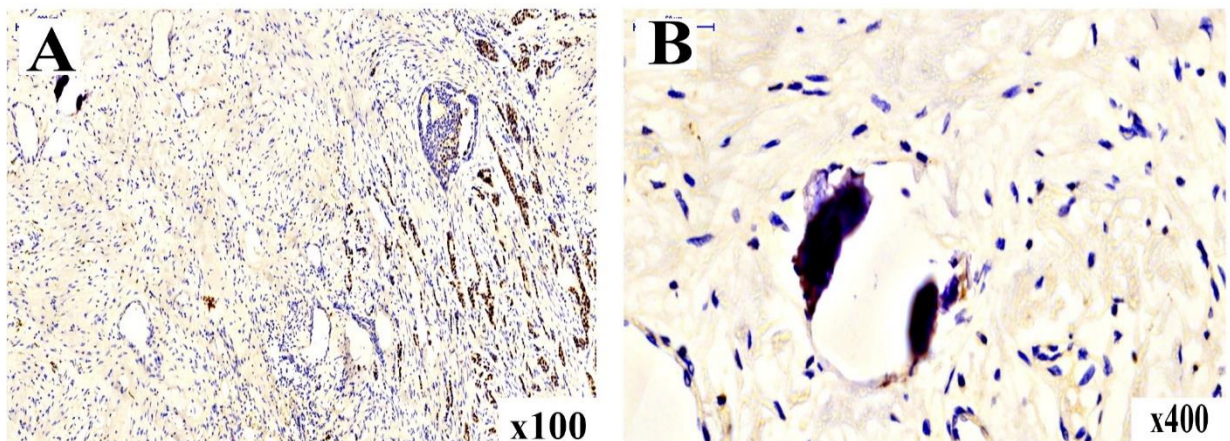


Рисунок 4.2. Ретроспективне імуногістохімічне дослідження експресії прогестерону у зразках РГЗ групи І. Контрастування ядер гематоксином Майера. А, В – збільшення вказане у правому нижньому куті кожного зображення.

Імуногістологічне експресії білка Her-2-neu проявлялася виразною мембранною реакцією (рис. 3.2.3). Цитоплазматичне забарвлення пухлинних клітин не враховувалося. Оскільки оцінка експресії білка Her-2-neu відбувається напівкількісним методом за методикою Герцептест (позитивна реакція відповідає значенню +++ або більше 20% пухлинних клітин з чіткою повною мембранною реакцією), то був порівняний відсотковий склад груп ІА та ІІА [1]. У ході визначення рівня експресії епідермального фактору росту Her-2-neu (група ІА) було встановлено, що лише 20,93% зразків пухлин було Her2-neu-позитивними. Близька присутність мікрокальцифікатів не здійснювала очевидного ефекту на рівень експресії білка Her2-neu у злоякісних пухлинних клітинах (Рис. 3.2.3 В).

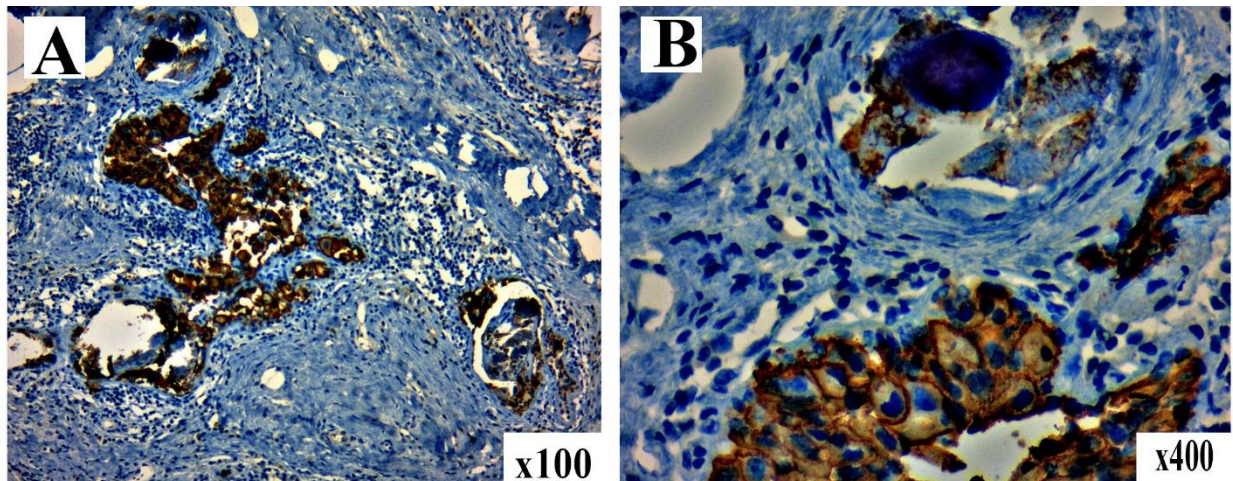


Рисунок 4.3 – Ретроспективне імуногістохімічне дослідження експресії епідермального фактору росту 2-neu у зразках РГЗ групи І. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. А, В – збільшення вказане у правому нижньому куті кожного зображення.

У групі ІІВ був проведений аналогічний ретроспективний аналіз результатів імуногістохімічного дослідження з метою порівняння та отримання відомостей про роль мікрокальцифікатів в експресії рецепторів естрогенів, прогестеронів та епідермального фактору росту Her-2-neu.

У групі зразків РГЗ ІІВ рівень експресії рецепторів естрогенів у середньому складав $58,63 \pm 4,25\%$, що також відповідало помірному рівню експресії рецепторів цього гормону (рис. 3.2.4).

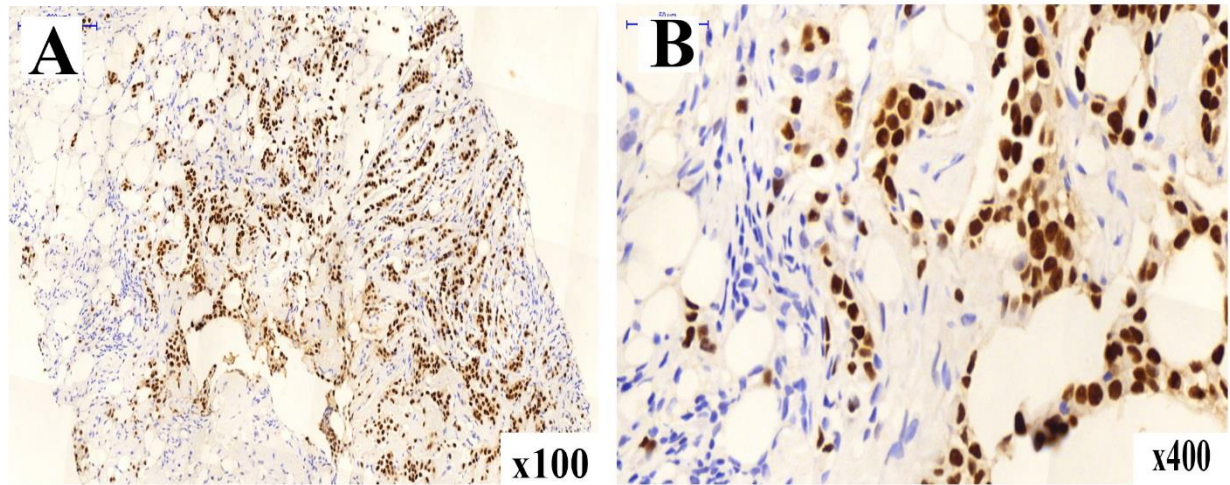


Рисунок 4.4 – Ретроспективне імуногістохімічне дослідження експресії естрогену у зразках РГЗ групи ІІ. Контрастування ядер гематоксилином Майєра. А, В – збільшення вказане у правому нижньому куті кожного зображення.

При імуногістохімічному дослідженні зразків злоякісних пухлин ГЗ групи ІІВ рівень прогестеронів відповідав $34,57 \pm 4,74\%$. Цей результат, з урахуванням квадратичного відхилення, балансував між низьким та середнім рівнем експресії прогестеронів (рис 4.5). У групі зразків РГЗ без кальцифікатів було виявлено лише 16,71% Her2-neu-позитивних злоякісних пухлин, у яких експресія відповідала значенню +++ (рис. 4.6).

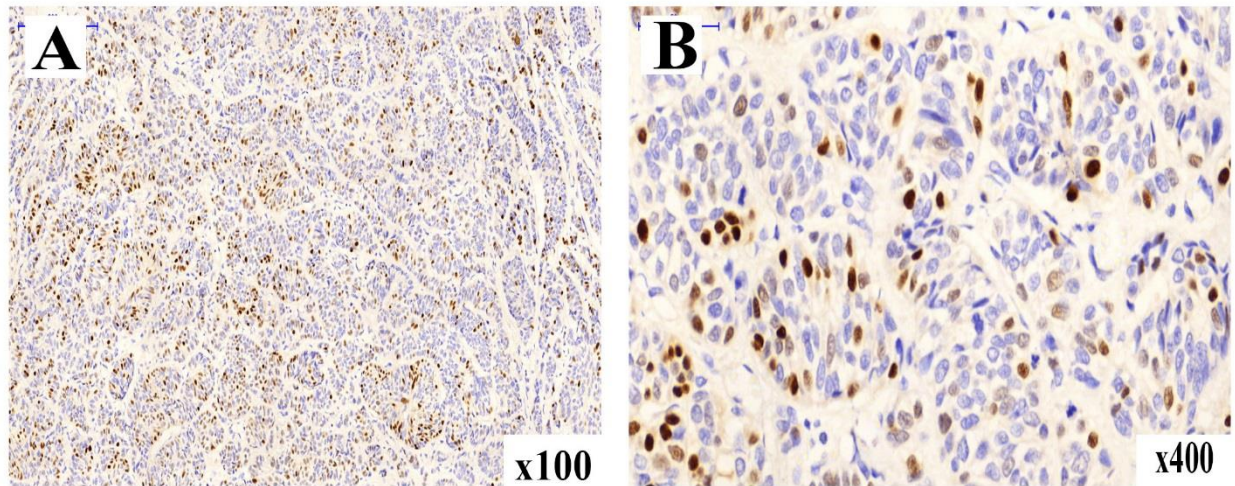


Рисунок 4.5 – Ретроспективне імуногістохімічне дослідження експресії прогестерону у зразках РГЗ групи II. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. А, В – збільшення вказане у правому нижньому куті кожного зображення.

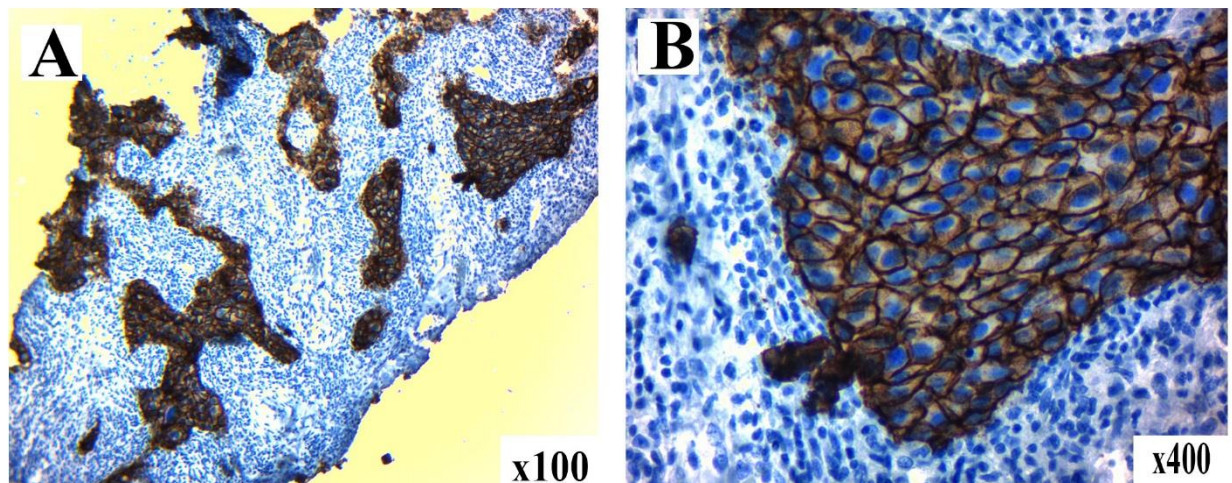


Рисунок 4.6 – Ретроспективне імуногістохімічне дослідження експресії епідермального фактору росту 2-неу у зразках РГЗ групи II. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. А, В – збільшення вказане у правому нижньому куті кожного зображення.

За отриманими результатами ретроспективного аналізу імуногістохімічного дослідження було проведене порівняння обох груп – знавністю та відсутністю мікрокальцифікатів.

Підрахунок середньої кількості позитивно забарвлених ядер пухлинних клітин показав, що у групі IA рівень експресії рецепторів естрогену складав $52,45 \pm 5,3 \%$, а рівень експресії рецепторів прогестерону складав $27,36 \pm 4,08\%$. У групі II рівень експресії рецепторів естрогену складав $58,63 \pm 4,25\%$ ($p > 0,05$), рівень прогестерону відповідав $34,57 \pm 4,74\%$ ($p > 0,05$) (рис. 3.2.7).

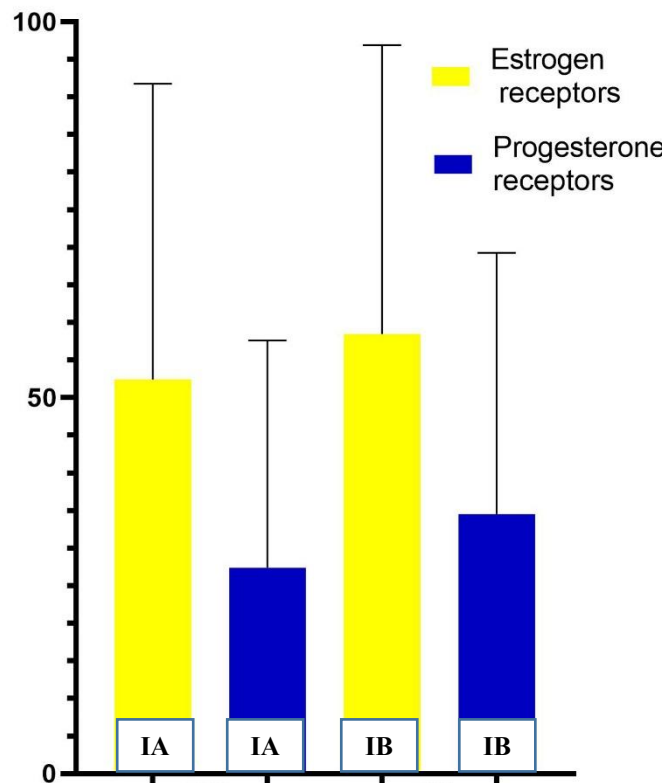


Рисунок 4.7 – Результати імуногістохімічного дослідження біопсійного матеріалу РГЗ антитілами проти рецепторів естрогенів та прогестеронів. Стовпчики жовтого кольору відображають результати визначення експресії рецепторів естрогенів у зразках РГЗ обох груп. Стовпчики синього кольору відображають результати визначення експресії рецепторів прогестеронів у зразках РГЗ обох груп. Назви груп вказані в основі відповідних стовпчиків.

У ході визначення рівня експресії епідермального фактору росту Her-2-неу (група IA) було встановлено, що 20,93% зразків пухлин, а у групі IB зразків було виявлено 16,71% Her2-неу-позитивних злоякісних пухлин, у яких експресія відповідала значенню +++.

neu обох груп за методом χ -квадрат вказало на відсутність достовірної різниці між ними ($p > 0,05$).

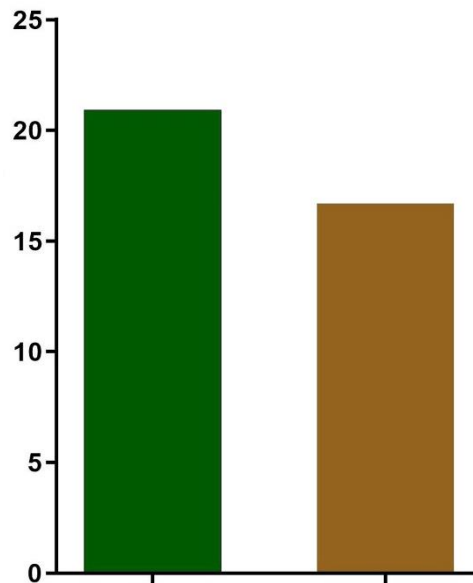


Рисунок 4.8 – Результати імуногістохімічного дослідження біопсійного матеріалу РГЗ антитілами проти епідермального фактору росту Her2-neu. Зелений стовпчик відповідає результатам оцінки експресії зразків групи IA, коричневий стовпчик відповідає результатам оцінки експресії зразків групи IB. Вісь абсцис показує процент позитивних (+++) зразків.

Таким чином, за результатами ретроспективного аналізу порівняння імуногістохімічної експресії рутинних маркерів РГЗ (рецептори естрогенів, прогестеронів та епідермального фактора росту Her2-neu) було встановлено відсутність достовірної різниці у групах зразків РГЗ з наявністю (група IA) та відсутністю (група IB) мікрокальцифікатів. Також не було відмічено прямого впливу близької локалізації мікрокальцифікатів у пухлинних тканинах на експресію рутинних діагностичних і прогностичних маркерів РГЗ, за виключенням наявності некротичної тканини навколо та одиничних випадків зниження експресії прогестеронів.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях: [201]

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ РАКУ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ З МІКРОКАЛЬЦИФІКАТАМИ

Макроскопічне дослідження зразків тканини РГЗ з мікрокальцифікатами

Для дослідження було відібрано 30 зразків РГЗ з мікрокальцифікатами. Остаточна верифікація відбувалася за допомогою гістологічного та гістохімічного дослідження. Середній вік пацієнток цієї групи складав $63,43 \pm 1,76$ року.

Тканина пухлини для досліджуваних зразків отримувалася під час макроскопічного дослідження видалених грудних залоз після повної мастектомії з лімфатичними вузлами та жирОВОЮ клітковиною. Макроскопічно тканина РГЗ була представлена частіше у вигляді нечітко окресленого вузла твердої консистенції та щільно з'єданого з оточуючою фіброзно-жирОВОЮ тканиною та зазубреними краями. Чіткість меж пухлин могла бути від доволі окресленої патологічної тканини до відсутності цих кордонів і переходу пухлинних мас у оточуючі тканини. Іноді пухлина була у вигляді рубцеподібної білуватої тканини, яка «стягує» до себе та деформує оточуючі тканини. Розмір пухлин варіювали від 1,0 до 5,0 см діаметром.

Під час секції пухлини мали вигляд вузлів сірувато-білого кольору, відмічалися ділянки крововиливів, жовтувато-некрозу, міксоматозу, дрібні кістозні утвори, заповнені жовтуватою або кров'янистою рідиною. У пухлинах часто відмічається наявність сіруватих тяжів, які поділяли пухлину на часточки (рис. 4.1 А, В). Іноді при розрізі твердої пухлинної тканини за відповідним звуком у вигляді «потріскування» виявлялись кальцифікати чи мінералізовані структури тканини.

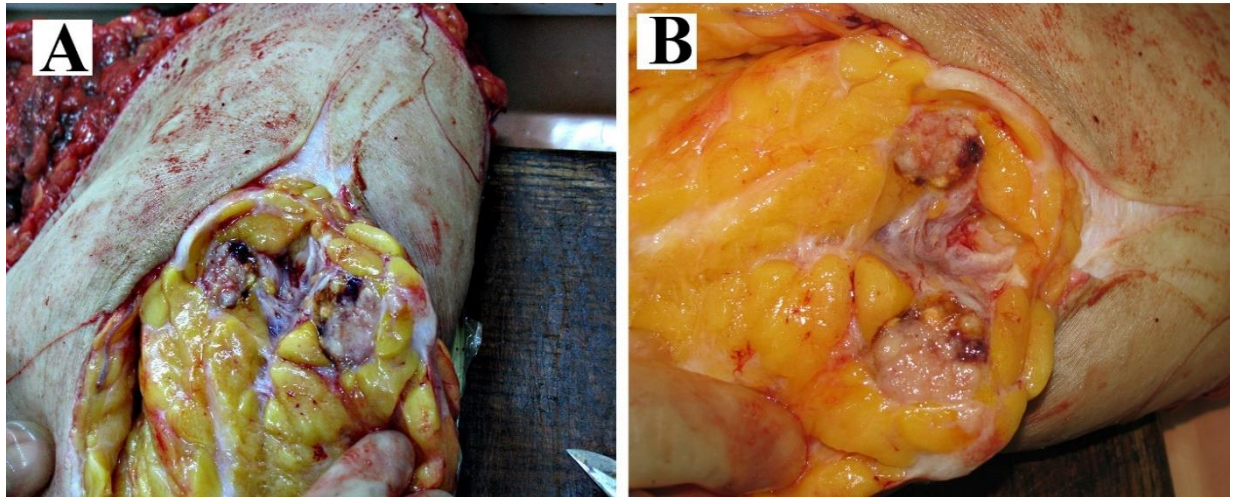


Рисунок 5.1.1 – Макроскопічне дослідження пухлинної тканини РГЗ I групи.

Гістологічне, гістохімічне та імуногістохімічне дослідження тканини РГЗ з мікрокальцифікатами

Досліджувані зразки тканини РГЗ I-ї групи були представлені поліморфними залозами, утвореними атиповими клітинами та оточені сполучнотканинним стромальним компонентом. Клітини часто формували гнізда, трабекули та кластери. Деякі зразки були представлені тубулярними структурами з просвітом. Пухлинні клітини містили поліморфні та гіперхромні ядра округлої форми з хроматичними та мітотичними фігурами, ядерцями та еозинофільною цитоплазмою. Клітини мали підвищену мітотичну активність та патологічні мітози. Пухлинні клітини виходили за межі базальної мембрани протоків (рис. 5.2.1 А-В).

В деяких зразках відмічались внутрішньопротокові включення у вигляді дрібних поліморфних клітин, які утворювали папілярні, криброзні конструкції. У зразках тканини були відмічені явища запальної інфільтрації.

В мікропрепаратах були наявні біомінеральні депозити, які були розташовані в усіх компонентах пухлинної тканини, а саме: паренхіма, строма та просвіт протоків (рис. 5.2.1 А-Д).

Варіанти розташування мікрокальцифікатів один відносно одного були різноманітними: поодинокі відкладення, вогнищеве скопичення, дифузне

розсіяння. Домінуючою формою мікрокальцифікатів були округлі, чітко контурованого біомінерали, що частіше виявлялися у просвіті залоз та протоків і повторювали їх форму (рис. 5.2.1 А-D). Також відмічалось відкладення біомінеральних депозитів у сполучній тканині у вигляді уламків пластинок, зерен, голок, стержнів, тощо. Нерідко спостерігались комбіновані варіанти.

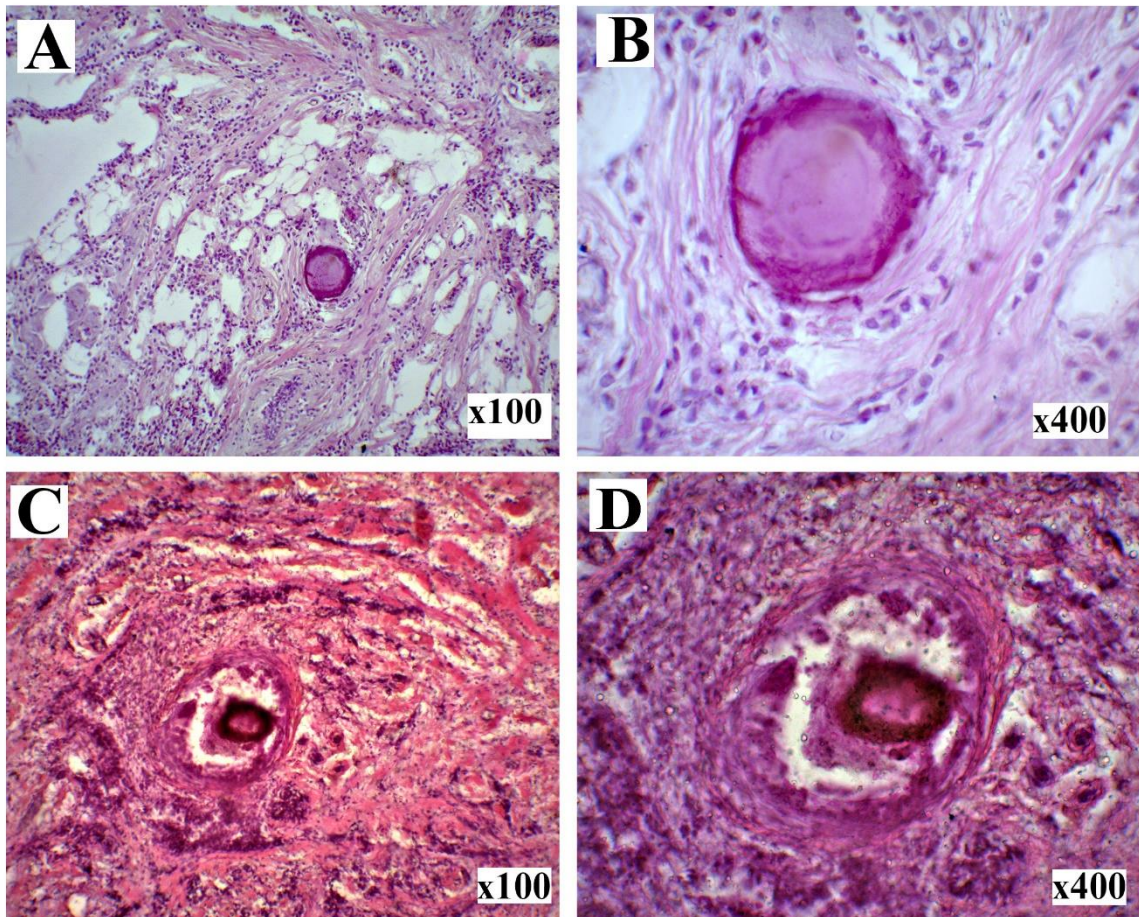


Рисунок 5.2.1 – Гістологічне дослідження пухлинної тканини РГЗ І групи. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

У ході гістологічного дослідження у частині препаратів (6 зразків) було виявлено біомінеральні депозити бурштинового кольору у прилягаючій інтактній тканині пухлинних зразків групи І при гістологічному дослідженні. Вони були більш прозорі та мали складну полігональну структуру (рис. 5.2.2 А-В). Загалом структура мікрокальцифікатів цього типу схожа на «хлібні

крихти» або грудочки з налипаннями дрібних елементів. Ці структури локалізувалися у просвіті розширених залоз грудної залози або мали зв'язок з їх просвітом (знаходилися недалеко біля залоз). Важливо відмітити, що залози грудної залози, які містили зазначені мікрокальцифікати, мали нормальну гістологічну структуру.

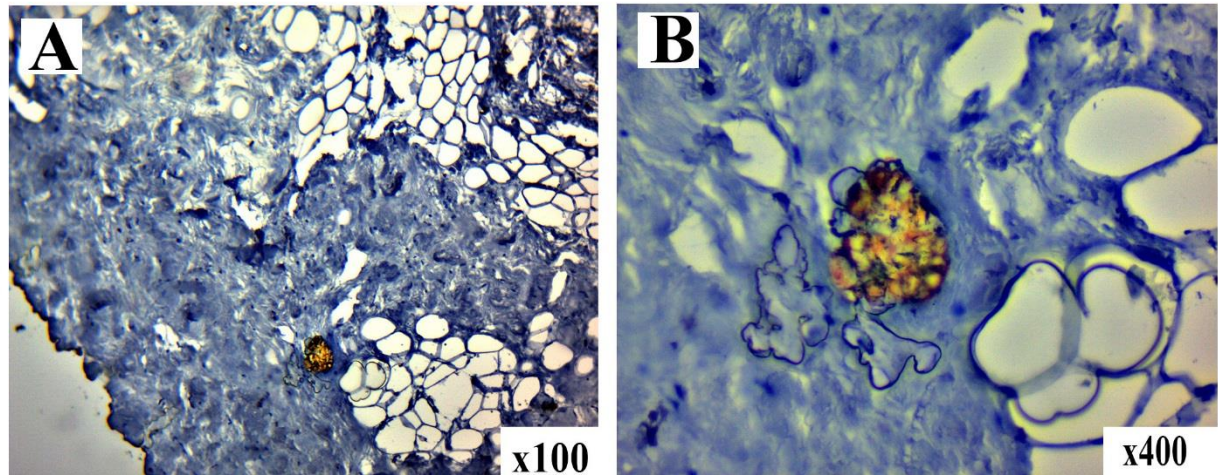


Рисунок 5.2.2 – Гістологічне дослідження пухлинної тканини РГЗ І групи. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Гістохімічне дослідження тканини РГЗ з мікрокальцифікатами

Зразки пухлинної тканини ГЗ 1-ї групи фарбувались сріблом фон Косса з метою виявлення сполук кальцію, а саме фосфатів кальцію. Мікрокальцифікати мали вигляд коричнево-бурих утворень розташованих як у пухлинній тканині, стромі, так і у просвіті залоз. Мали різну форму: округлу, сферичну, пластинчасту та зерноподібну. Біомінеральні депозити мали неоднорідну структуру та різний ступінь накопичення срібла (рис. 5.3.1 А-В).

Гістохімічне забарвлення за методом фон Косса для окремих мікрокальцифікатів давало суперечливі результати (рис. 5.3.2 А-В). Незважаючи на відсутність класичного коричневого кольору (осадження срібла на сполуках кальцію фосфата), виявлялося нетипове червонувате забарвлення структур, які відповідали біомінеральним депозитам, подібних до

зображених на рис. 5.2.2. Це може бути пов'язане з осадженням контрастного барвника (ядерний швидкий червоний) на біомінеральних структурах.

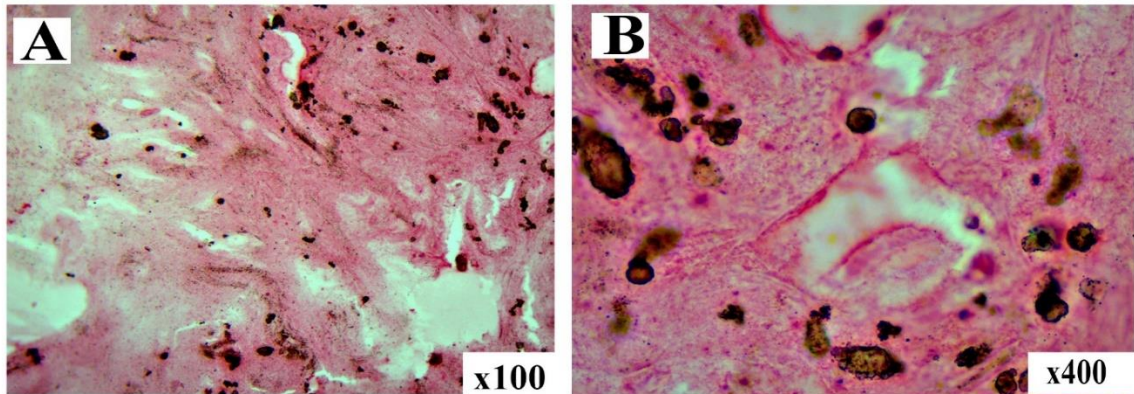


Рисунок 5.3.1 – Гістохімічне дослідження пухлинної тканини РГЗ І групи. Забарвлення за фон Коссом. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

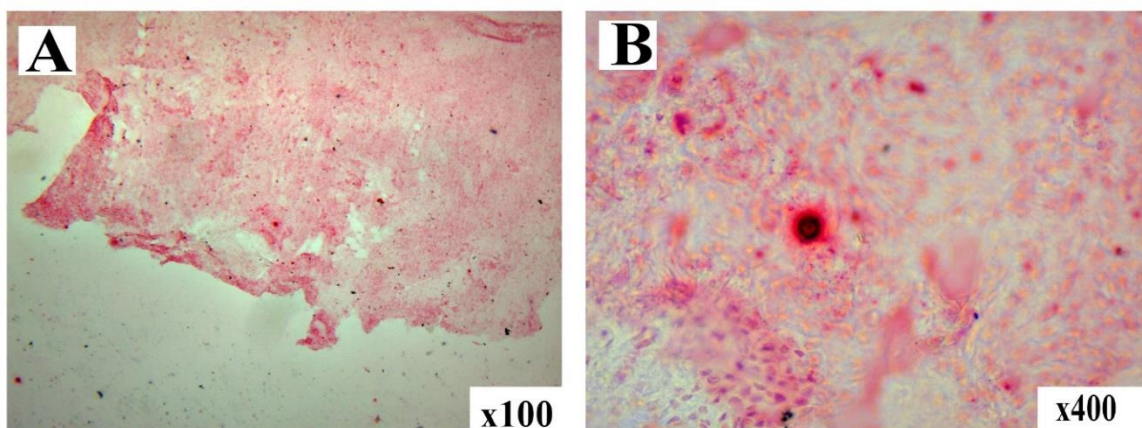


Рисунок 5.3.2 – Гістохімічне дослідження пухлинної тканини РГЗ І групи. Забарвлення за фон Коссом. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

У тканині РГЗ І-ї групи при застосуванні універсального барвника для виявлення сполук кальцію алізаринового червоного були виявлені біомінеральні депозити в протоках, пухлинній тканині та стромальному компоненті. Мікрокальцифікати, виявлені за допомогою алізаринового червоного мали відтінки червоного кольору, їх розташування співпадало з

локалізацією мікрокальцифікатів РГЗ при забарвленні за фон Коссом: протоковій системі ГЗ, пухлинній тканині, стромі (рис. 5.3.3 А-В).

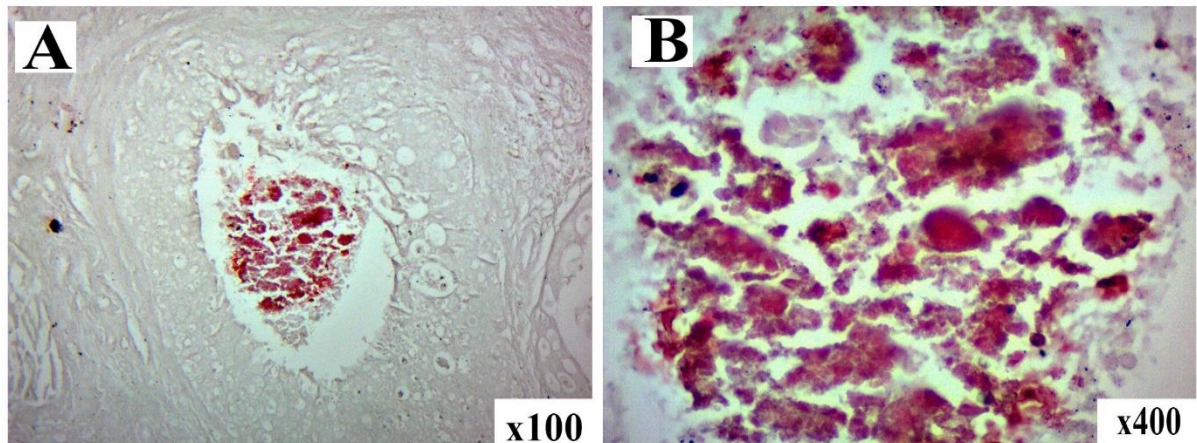


Рисунок 4.3.3 – Гістохімічне дослідження пухлинної тканини РГЗ І групи. Забарвлення алізариновим червоним. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Оскільки, за отриманими попередніми даними, забарвлення мікрокальцифікатів РГЗ за методом фон Косса було неоднорідним, було цікаво перевірити взаємодію «інакших» біомінеральних утворень за допомогою більш універсального методу забарвлення сполук кальцію. Біомінеральні депозити бурштинового кольору у прилягаючій інтактній тканині пухлинних зразків та у просвіті розширених залоз групи І мають добре забарвлення алізариновим червоним (рис. 5.3.4 А-В), на відміну від методу фон Косса.

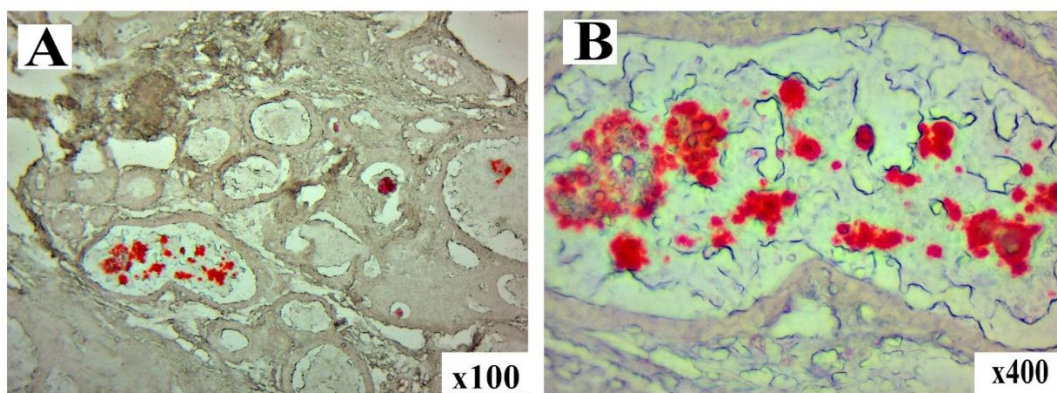


Рисунок 5.3.4 – Гістохімічне дослідження пухлинної тканини РГЗ І групи. Забарвлення алізариновим червоним. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Для виявлення присутності вуглеводневих сполук у зразках тканини РГЗ I групи було проведено PAS-реакцію. Дослідження показало доволі значну присутність полісахаридів та комплексних вуглеводневих сполук у більшості зразках РГЗ з мікрокальцифікатами. В першу чергу це стосувалося внутрішньопотокового вмісту, асоційованого зі слизом (рис. 5.3.5 А). У пухлинній тканині окремих зразків також було виявлені помітні відкладення PAS-позитивного матеріалу – як позаклітинно, так і в цитоплазмі (рис. 5.3.5 В). Окрім того, відкладення PAS – позитивної речовини відмічалось в стромальному сполучнотканинному компоненті пухлини.

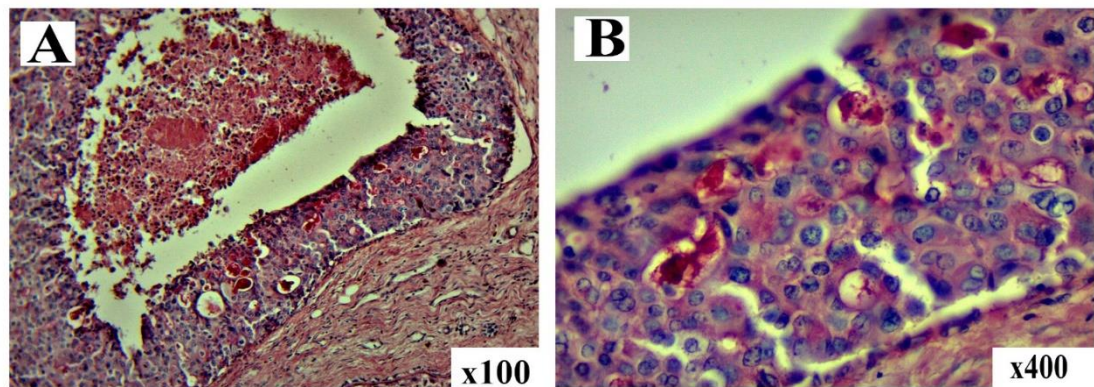


Рисунок 5.3.5 – Гістохімічне дослідження пухлинної тканини РГЗ I групи. Забарвлення PAS-реакцією. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

ІГХ дослідження тканини зразків РГЗ з мікрокальцифікатами

Для дослідження використовували панель з остеотропних маркерів (OPN, SPARC, RANKL, OPG) та панель маркерів з макрофагами (CD68, CD163).

ІГХ дослідження тканини інвазивного протокового РГЗ з антитілом проти OPN показало виражену позитивну змішану цитоплазматично-мембранну експресію рецепторів у пухлинних клітинах, фібробластах та запальному інфільтраті. Частково позитивна експресія спостерігалась у стромі пухлини, яка проявлялась дифузно забарвленими фібробластами та волокнами сполучної тканини (рис. 5.4.1 А-В). Також було відмічалась спорідненість

остеопонтину з мікрокальцифікатами. Нами спостерігався підвищений рівень фонового забарвлення хромогеном (ДАБ), очевидно пов'язаний з осіданням значної кількості дрібних кальцій-фосфатних фрагментів та уламків біомінеральних утворень на тканинах зразків під час імуногістохімічного дослідження. У тканині РГЗ І групи було виявлено $91,75 \pm 3,24$ OPN-позитивних клітин в одиниці виміру площі.

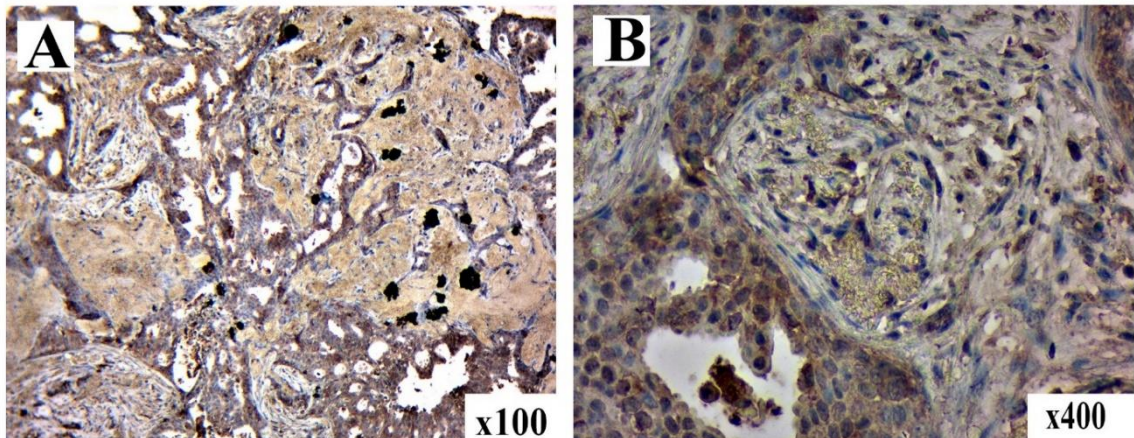


Рисунок 5.4.1 – ІГХ дослідження експресії OPN у тканині РГЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

ІГХ дослідження зразків групи І показало помірну або низькоінтенсивну експресію глікопротеїну SPARC у цитоплазмі пухлинних клітин (рис. 5.4.2 А-В). Прямого зв'язку або тропності SPARC безпосередньо до біомінеральних депозитів виявлено не було. Глікопротеїн SPARC активно експресувався у клітинах пухлинного мікрооточення, переважно у лімфоцитах запального інфільтрату. Помірний рівень фонового забарвлення ДАБ був присутній у більшості препаратів. У тканині РГЗ І групи було виявлено $76,13 \pm 3,79$ SPARC-позитивних клітин в одиниці виміру площі.

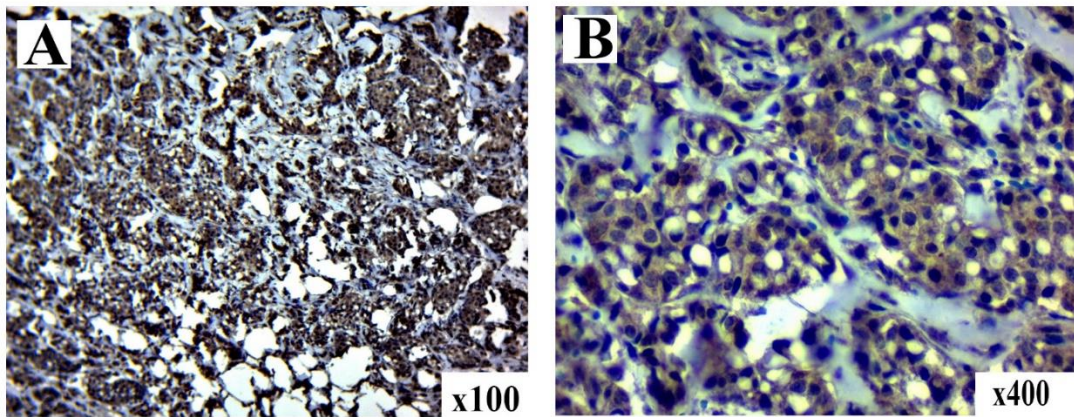


Рисунок 5.4.2 – ІГХ дослідження експресії SPARC у тканині РГЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксилином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Під час імуногістохімічного дослідження тканини зразків РГЗ І групи було відмічено широкий спектр експресії OPG у цитоплазмі пухлинних клітин від низької до помірно-інтенсивної (рис. 5.4.3 А,В). На відміну від попередніх маркерів, пухлинне клітинне мікрооточення взаємодіяло з OPG слабо, відмічалась лише незначна кількість позитивно забарвлених клітин запального інфільтрату та строми.

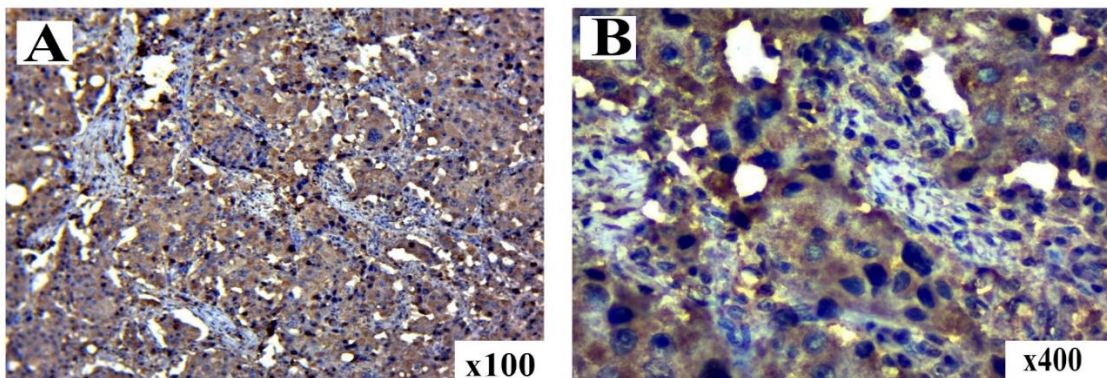


Рисунок 5.4.3 – ІГХ дослідження експресії OPG у тканині РГЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксилином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Фонове забарвлення при цьому імуногістохімічному дослідженні виявлялось у ділянках некрозів, міксоматозу та вмісту просвіту судин та

протоків. Зразки РГЗ І групи у середньому містили $84,88 \pm 3,73$ OPG-позитивних клітин в одиниці виміру площі.

При проведенні ІГХ дослідження зразків РГЗ з мікрокальцифікатами з антитілами проти RANKL була виявлена виражена низько- і помірна експресія цього рецептора у пухлинних клітинах РГЗ (рис. 5.4.4). Очевидного зв'язку позитивного забарвлення RANKL пухлинних тканин та наявності мікрокальцифікатів виявлено не було. Подібно до OPG, залучення клітин пухлинного мікрооточення було низьким. Переважно це були клітини запального інфільтрату. Фонове забарвлення було присутнім у ділянках некрозів, ослизнення та вмісту протоків і судин. Тканина зразків РГЗ з мікрокальцифікатами містила $75,71 \pm 4,6$ RANKL-позитивних клітин в одиниці виміру площі.

Імуногістохімічне дослідження тканини протокового інвазивного РГЗ з антитілами проти CD68 показало інтенсивну позитивну цитоплазматичну реакцію у макрофагах пухлинного мікрооточення. Макрофаги локалізувалися у стромі навколо пухлинної тканини, частина клітин проникала між солідними пластами пухлинного епітелію. Також позитивна реакція спостерігалася у частині ендотеліоцитів та фібробластів (рис. 5.4.5). У тканині РГЗ І групи було виявлено $60,85 \pm 2,71$ CD68-позитивних клітин в одиниці виміру площі.

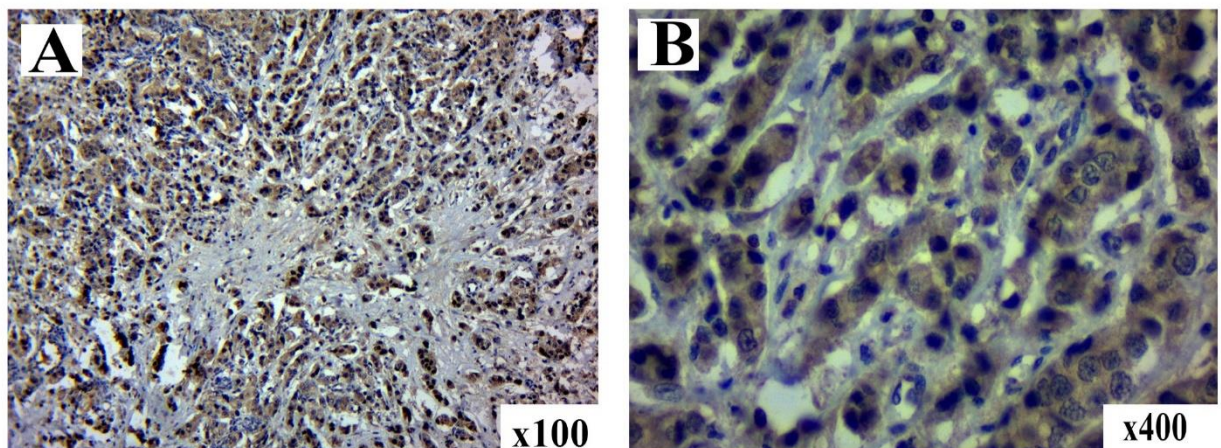


Рисунок 5.4.4 – ІГХ дослідження системи RANKL у тканині РГЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

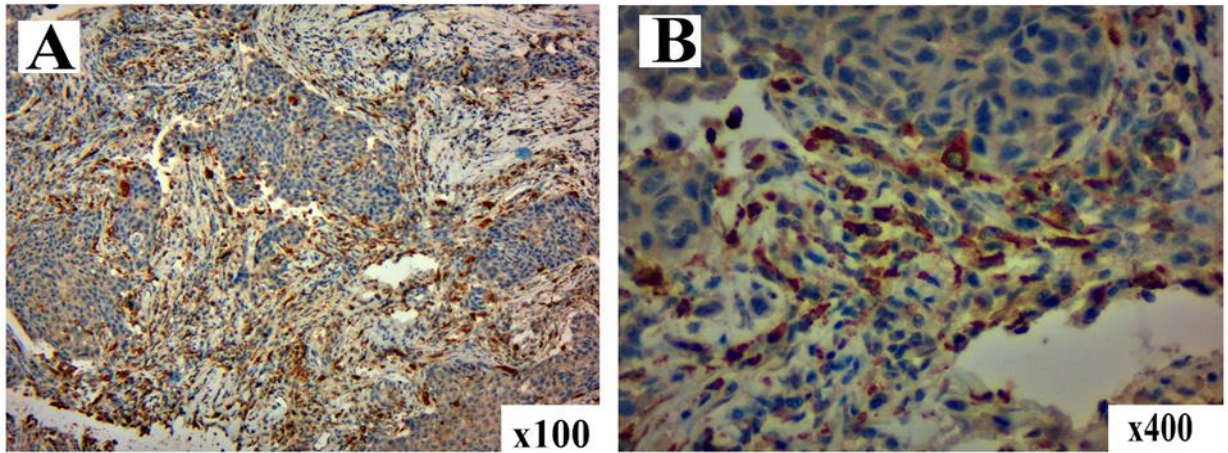


Рисунок 5.4.5 – ІГХ дослідження антитілами проти CD 68 у тканині РГЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Для оцінки запальної інфільтрації була застосована система макрофагів CD163. У ході дослідження з антитілами проти CD163 була виявлена помірна цитоплазматична та частково мембранна позитивна реакція пухлинних клітин та стромального компоненту у якості забарвлення фібробластів. Веретеноподібних клітин. Також позитивна реакція спостерігалась у частині ендотелію (рис. 4.4.5). У тканині РГЗ І групи було виявлено $53,21 \pm 3,05$ CD163-позитивних клітин в одиниці виміру площі.

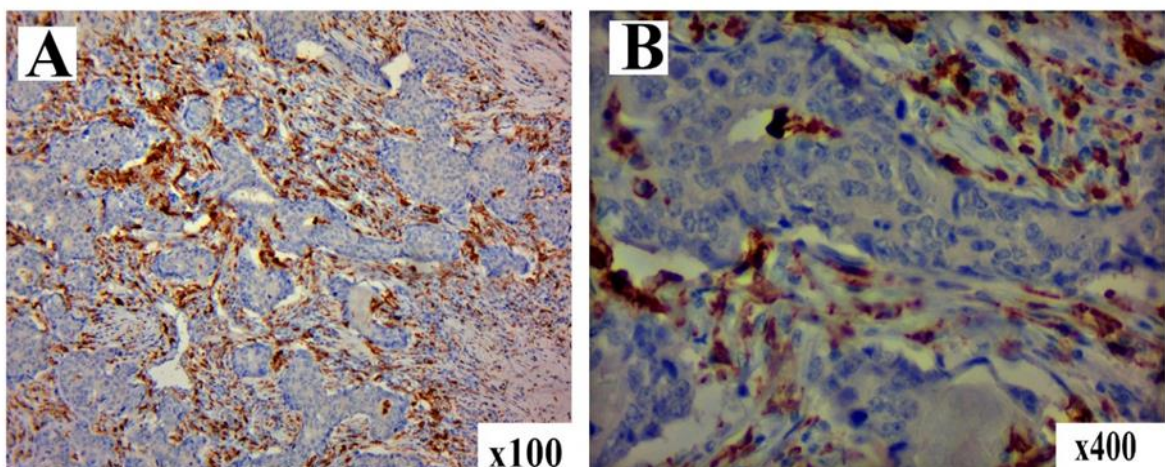


Рисунок 5.4.6 – ІГХ дослідження антитілами проти CD163 у тканині РГЗ І групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Отже, у ході дослідження було виявлено присутність сполук солей кальцію у всіх зразках групи I. З іншого боку, у 6 випадках було виявлено мікрокальцифікати відмінної природи поряд з типовими біомінеральними депозитами. Однак знову слід відмітити принципову різницю локалізації даних утворень. Поєднання різного типу мікрокальцифікатів у частині випадків інвазивного раку ГЗ на перший погляд знижує можливий діагностичний потенціал патологічної біомінералізації. Проте просторова локалізація мікрокальцифікатів у проведеному дослідженні має певну різницю. Мікрокальцифікати бурштинового кольору та з негативним забарвленням за методом фон Косса виявляються у просвітах і протоках розширених залоз, сполучна і жирова тканина грудної залози. Гістохімічне забарвлення з алізариновим червоним добре забарвлює обидва типи мікрокальцифікатів.

OPN забарвлює як цитоплазму клітин (в основному, виробників цього білка), так і позаклітинних структур – поверхні кальцифікатів, волокон, місць формування біомінералів. На відміну від OPN, інші остеобластичні маркери не виявили прямої асоціації чи тропізму до поверхні патологічних біомінеральних утворень. При порівнянні імуногістохімічної експресії маркерів макрофагів CD68 та CD163 у зразках РГЗ з мікрокальцифікатами було виявлено переважання присутності прозапальних макрофагів типу M1.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[201, 204, 205, 206, 207, 211]

РОЗДІЛ 6

ДОСЛІДЖЕННЯ ТКАНИНИ РГЗ БЕЗ МІКРОКАЛЬЦИФІКАТІВ

Морфологічне дослідження зразків тканини РГЗ без мікрокальцифікатів

Для дослідження було відібрано 30 зразків РГЗ без ознак патологічної біомінералізації. Контроль зразків відбувався шляхом гістологічного та гістохімічного дослідження операційного матеріалу. Середній вік пацієнток цієї групи складав $61,71 \pm 1,5$ року.

Тканина пухлини для досліджуваних зразків були отримані під час макроскопічного дослідження видалених грудних залоз після повної мастектомії з лімфатичними вузлами та жировою клітковиною. При макроскопічному дослідженні тканини РГЗ була представлена у вигляді вузлів щільної консистенції з нерівними, поліциклічними краями, які тісно поєднувалися з оточуючою фіброзно-жировою тканиною. Часто пухлина мала вигляд рубця або тяжистої білуватої тканини (рис. 5.1 А, В). Розмір пухлин варіювали від 0,5 до 7,0 см діаметром.

При розрізанні тканини пухлин мали сірувато-білий колір, чим фактично не відрізнялися від зразків І групи. Частим явищем у пухлинних тканинах були вторинні зміни у вигляді точкових крововиливів, ділянок некрозу, ослизнення, поодиноких кіст.

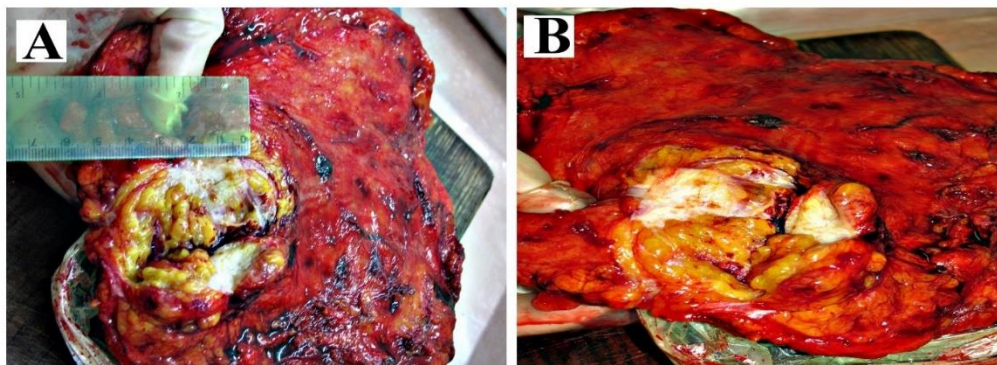


Рисунок 6.1.1 – Макроскопічне дослідження пухлинної тканини РГЗ II групи.

Гістологічне дослідження тканини РГЗ без мікрокальцифікатів

Гістологічне дослідження зразків тканин РГЗ II групи показало, що всі зразки відповідали інвазивному протоковому РГЗ. Пухлинна тканини були представлені у вигляді поліморфних залоз, що склалися з атипових клітин, та стромального компоненту. Пухлинні клітини формували гнізда, трабекули та розташовувались згруповано або у вигляді «цугів» чи індивідуальних клітин у товщі строми. Частина атипових пухлинних залоз була з просвітом, інша частина – формувала солідні поля пухлинної тканини (рис. 6.2.1 А). У пухлинних клітинах були присутні поліморфні та гіперхромні ядра округлої форми з хроматичними та мітотичними фігурами, ядерцями та еозинофільною цитоплазмою (рис. 6.2.1 В). Окрім гіперхромних, спостерігалися ядра з порожньою, просвітленою цитоплазмою за типом «скляних ядер». Також у пухлинній тканині виявлялася запальна змішаноклітинна інфільтрація, яка спостерігалася між пухлинними солідними полями у центральних і периферійних зонах пухлини.

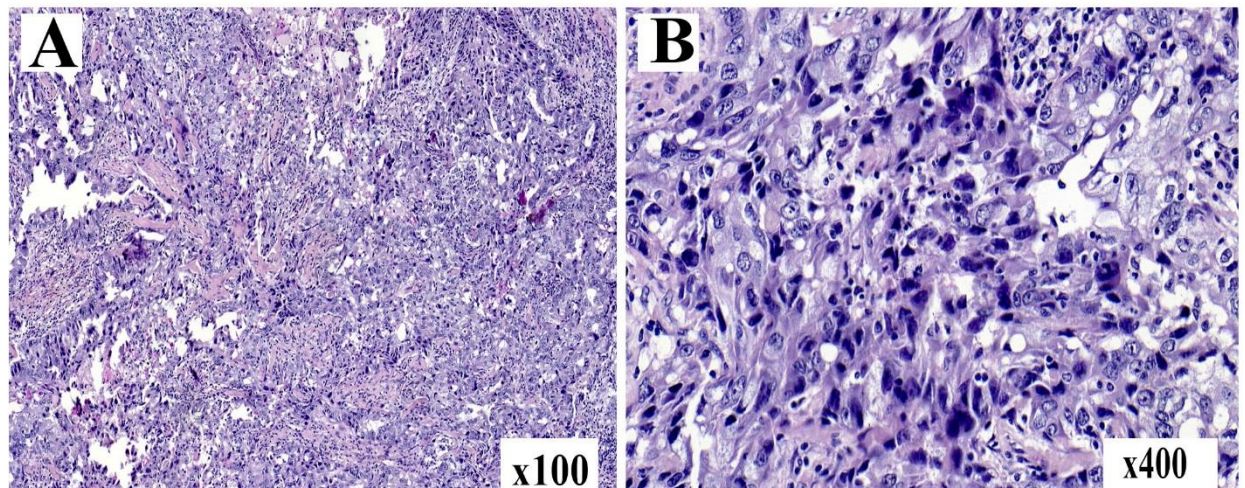


Рисунок 6.2.1 – Гістологічне дослідження пухлинної тканини РГЗ I групи. Забарвлення гематоксилін-еозином. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

У пухлинній тканині нерідкими були ділянки некрозів, крововиливів, дистрофічних змін. Серед пухлинних мас виявлялися апоптотичні тільця у вигляді рожевих округлих вакуоль.

Гістохімічне дослідження тканини РГЗ без мікрокальцифікатів

У зразках пухлинної тканини II групи при забарвленні сріблом за методом фон Косса відмічалась негативна реакція, що свідчило про відсутність мікрокальцифікатів у зразках досліджуваної тканини. (рис. 6.3.1).

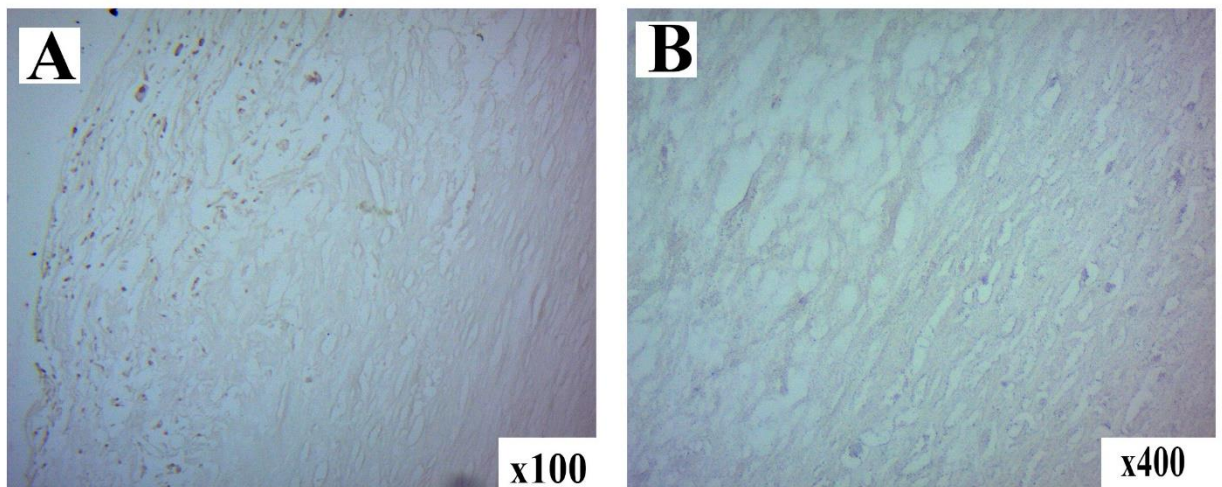


Рисунок 6.3.1 – Гістохімічне дослідження пухлинної тканини РГЗ II групи. Забарвлення за фон Коссом. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Відсутність патологічної біомінералізації у зразках тканини РГЗ II групи додатково було підтверджено за допомогою застосування барвника алізаринового червоного. (рис. 6.3.2).

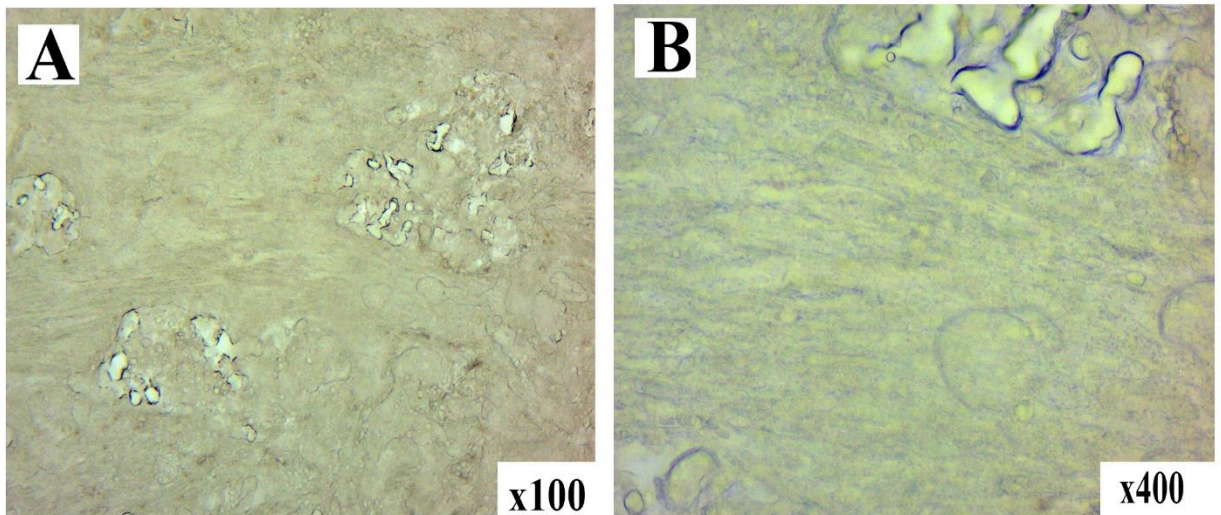


Рисунок 6.3.2 – Гістохімічне дослідження пухлинної тканини РГЗ II групи. Забарвлення барвником алізариновим червоним. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

При проведенні PAS-реакції у тканині зразків РГЗ II групи була виявлена слабкопозитивна реакція у стромальному компоненті пухлини. У просвіті атипичних пухлинних залоз та у протоках виявлялися помірна PAS-позитивна реакція у детриті та залишках секрету (рис. 6.3.3 А-В). Зрідка виявлявся PAS-позитивний вміст у цитоплазмі атипичних пухлинних клітин, незначні точкові депозити секрету у сполучній тканині.

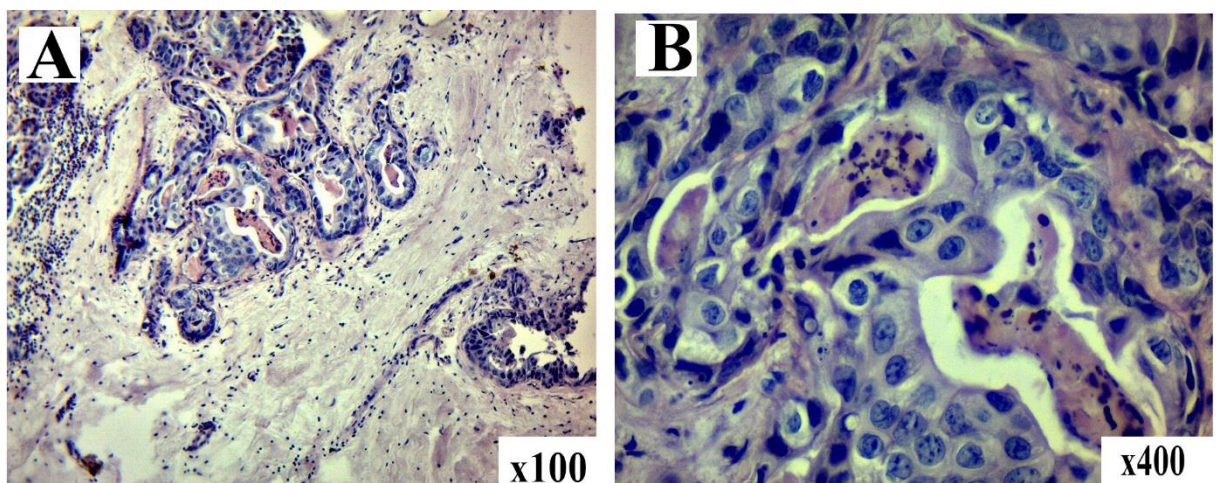


Рисунок 6.3.3 – Гістохімічне дослідження пухлинної тканини РГЗ I групи. Забарвлення PAS-реакцією. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

ІГХ дослідження тканини зразків РГЗ без мікрокальцифікатів

Нами було проведено ІГХ дослідження тканини інвазивного протокового РГЗ II групи з антитілом проти OPN. Дослідження показало помірну позитивну змішану цитоплазматично-мембранну експресію білка з переважною локалізацією у неопластичних клітинах (рис. 6.4.1). Рівень осадження діамінобезидину при проведенні ІГХ дослідження у клітинах пухлинного мікрооточення був невисоким: позитивна реакція виявлялася у незначній кількості веретеноподібних клітинах стромального компоненту (фібробласти, ендотеліоцити) пухлини. Необхідно зазначити дифузне забарвлення стромы пухлини. Фонове забарвлення діамінобензидином знаходиться на низькому рівні. Загалом, у тканині РГЗ II групи було виявлено $76,62 \pm 3,26$ OPN-позитивних клітин в полі зору.

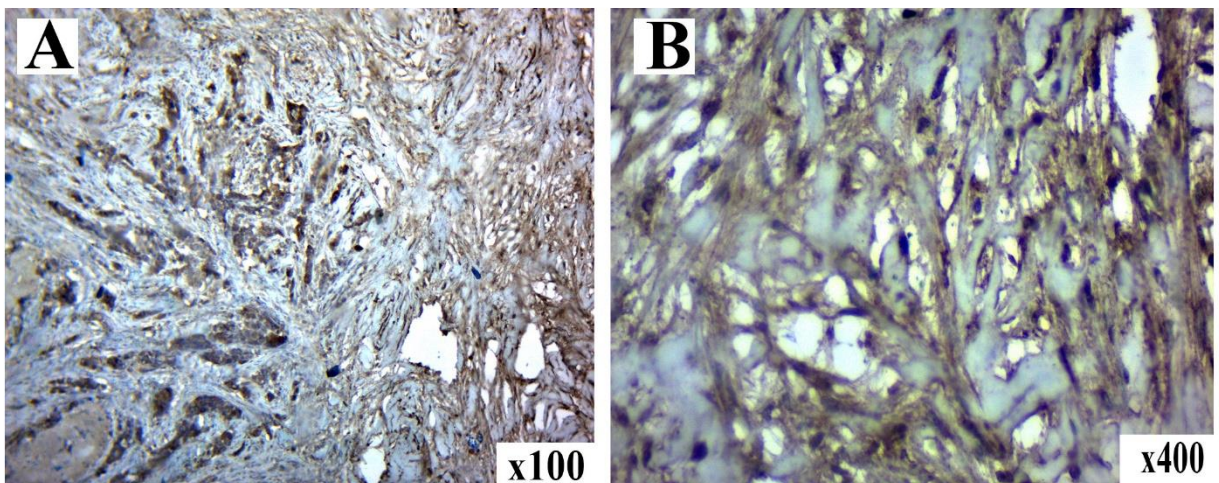


Рисунок 6.4.1 – ІГХ дослідження експресії OPN у тканині РГЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксилином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

У ході ІГХ дослідження експресію глікопротеїну SPARC зразків РГЗ II групи було виявлено позитивну низькоінтенсивну цитоплазматичну реакцію у пухлинних клітинах (рис. 6.4.2). Експресія білка SPARC виявлялася у клітинах пухлинного мікрооточення. Більшість з цих клітин за фенотипом відносилися до лімфоцитів запального інфільтрату. Помірний рівень фонового забарвлення хромогеном ДАБ був поєднаний з стромальним компонентом пухлини. У

тканині РГЗ II групи було виявлено $61,98 \pm 2,37$ SPARC-позитивних клітин в полі зору діаметром 1000 мкм.

При імуногістохімічному дослідженні зразків РГЗ II групи з антитілами проти OPG була виявлена його позитивна експресія у частині пухлинних клітин. Позитивна реакція була помірної та низької інтенсивності у вигляді позитивної цитоплазматичної реакції, у деяких мікропрепаратах відмічалась перинуклеарна цитоплазматична концентрація остеопротегенрину. Як і в I групі, пухлинне клітинне мікрооточення РГЗ взаємодіяло з OPG також слабо, була виявлена незначна кількість позитивно забарвлених клітин запального інфільтрату та стромы. Фонове забарвлення мікропрепаратів було на низькому рівні, переважно виявлялося у ділянках некрозів. (рис. 5.4.3). У тканині РГЗ II групи було виявлено $55,24 \pm 3,48$ OPG-позитивних клітин в полі зору діаметром 1000 мкм.

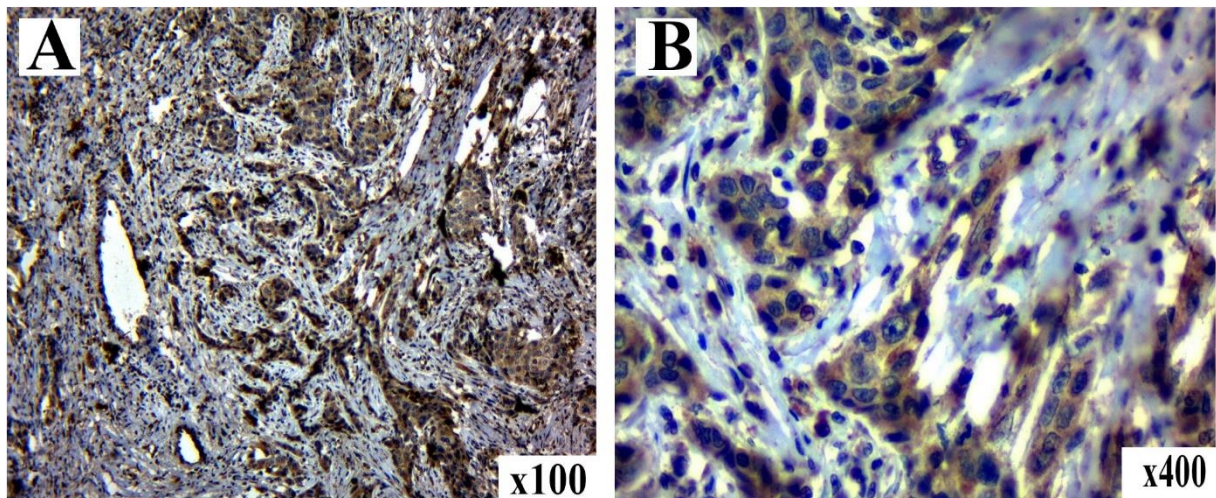


Рисунок 6.4.2 – ІГХ дослідження експресії SPARC у тканині РГЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

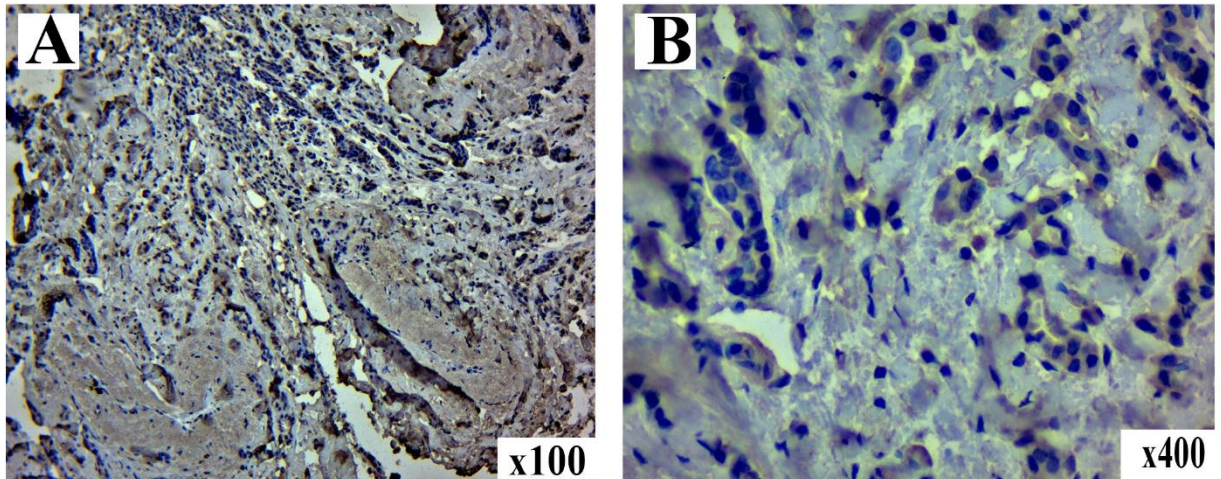


Рисунок 6.4.3 – ІГХ дослідження експресії OPG у тканині РГЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

У ході ІГХ дослідження зразків РГЗ II групи з антитілами проти RANKL була виявлена позитивна реакція у частині пухлинних клітин. Експресія лігандів RANKL мала цитоплазматичну локалізацію, а також точкову мембранну, у більшості випадків була низької інтенсивності. Нами була відмічена мозаїчність імуногістохімічного забарвлення пухлинної тканини: ділянки з помірною експресією RANKL чергувалися з відсутністю забарвлення. У клітинах пухлинного мікрооточення експресія ліганду була низькою, без чіткого переважання певних клітин. Фонове забарвлення було присутнім у ділянках некрозів, ослизнення та вмісту протоків і судин. Тканина зразків РГЗ II групи містила $72,13 \pm 2,73$ RANKL-позитивних клітин в одиниці виміру площі діаметром 1000 мкм (рис. 6.4.4).

ІГХ дослідження тканини РГЗ II групи з антитілами проти CD68 показало інтенсивну позитивну цитоплазматичну реакцію макрофагів, переважно у стромі навколо пухлинної тканини та некротизованій пухлинній тканині.

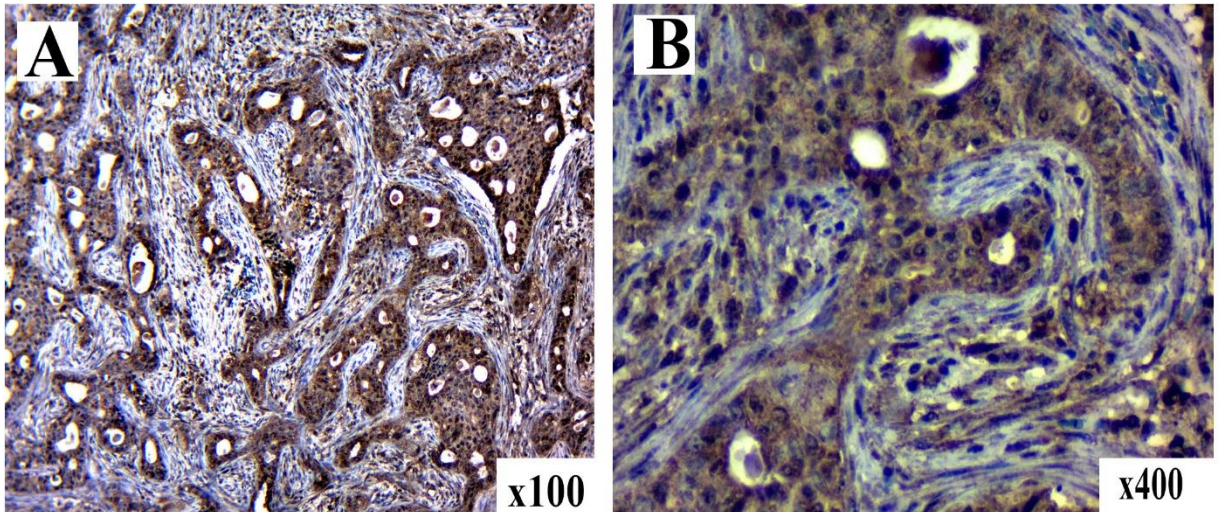


Рисунок 6.4.4 – ІГХ дослідження системи RANKL у тканині РГЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Невелика кількість CD68-позитивних клітин знаходиться серед пухлинних пластів (рис. 6.4.5 А-В). У контрольній групі також відмічається явище фальшивого забарвлення частини інших клітин пухлинного мікрооточення: ендотеліоцитів, фібробластів, перицитів. У тканині РГЗ II групи було виявлено $51,14 \pm 2,89$ CD68-позитивних клітин у полі зору діаметром 1000 мкм.

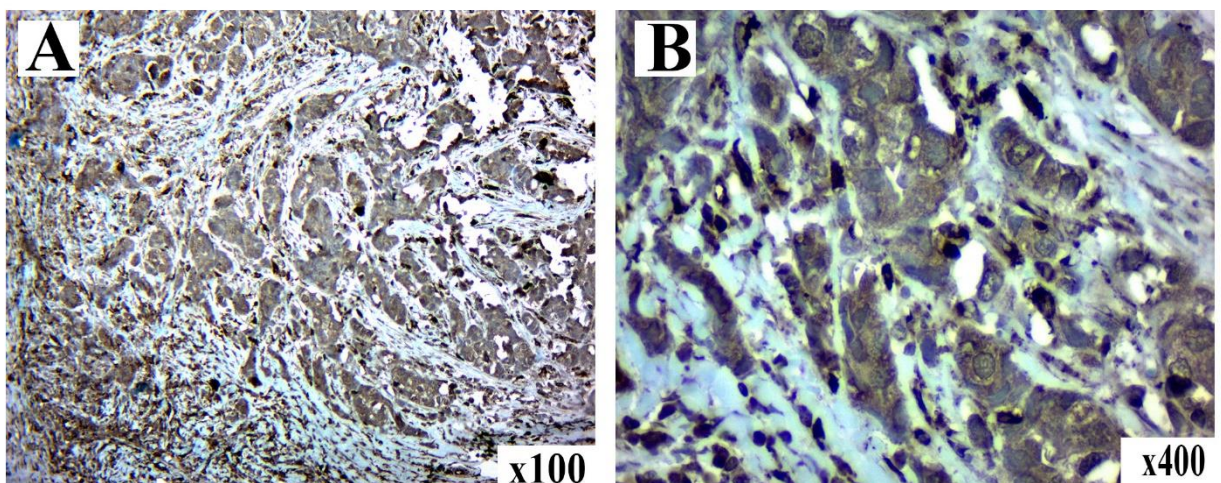


Рисунок 6.4.5 – ІГХ дослідження антитілами проти CD 68 у тканині РГЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксиліном Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

При використанні антитіл проти CD 163 у тканині РГЗ II групи показало подібність компартментизації позитивно-забарвлених клітин до результатів групи I. Ми знаходили CD163-позитивні клітини у стромі та частину з них у товщі пухлинних тканин (рис. 6.4.6). Ці пухлини відповідали фенотипу макрофагів. CD163-макрофаги значно рідше знаходилися у некротичних тканинах і запальних інфільтратах.

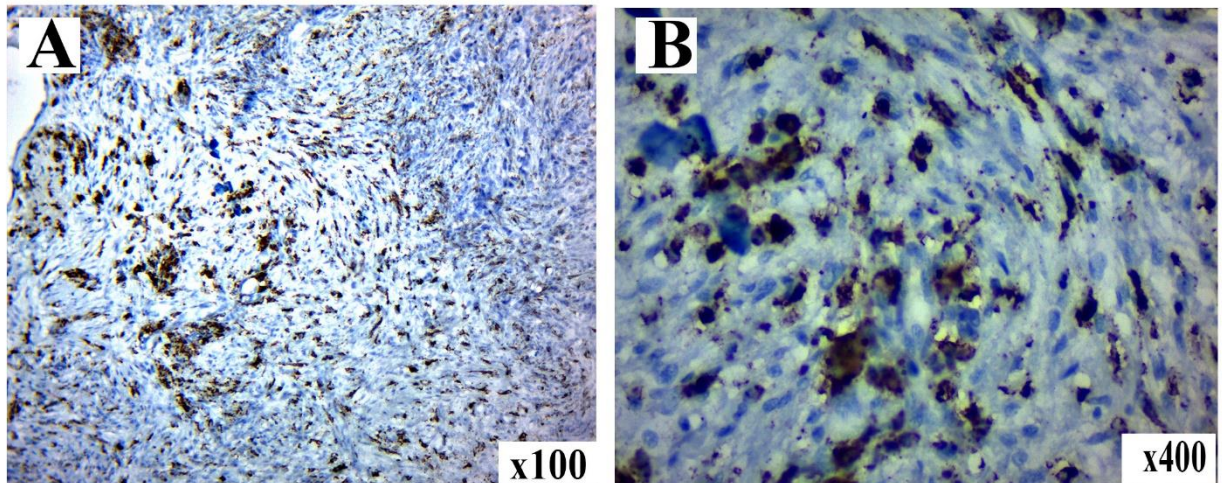


Рисунок 6.4.6 – ІГХ дослідження антитілами проти CD 163 у тканині РГЗ II групи. Хромоген ДАБ. Контрастування ядер гематоксилином Майєра. Збільшення вказано у правому нижньому куті кожного зображення.

Ми також відмічали додаткове охоплення ендотелію та фібробластів при імуногістохімічному забарвленні тканини зразків групи II з антитілами проти CD163. У тканині РГЗ II групи було виявлено $65,57 \pm 3,75$ CD163-позитивних клітин в одиниці виміру площі діаметром 1000 мкм.

Отже, у ході мікроскопічного дослідження за допомогою гістологічного, гістохімічного та імуногістохімічного методів II групи зразків РГЗ була верифікована відсутність ознак патологічної біомінералізації у досліджуваних тканинах. Інтенсивність накопичення PAS-позитивних сполук у тканині РГЗ без мікрокальцифікатів була невисокою.

При імуногістохімічному оцінюванні зразків II групи щодо експресії остеобластичних маркерів OPN, SPARC, OPG, RANKL загалом було виявлено

позитивну реакцію низької та помірної інтенсивності у більшості пухлинних клітин та частково у клітинах пухлинного мікрооточення.

Імуногістохімічне дослідження експресії CD68- та CD163-позитивних клітин у тканині РГЗ II групи показало перевагу M2 макрофагів над M1 макрофагами. Отримані результати мають деякі обмеження та застереження. Основна проблема полягає в позитивному забарвленні CD68- та CD163 маркерами деяких популяцій клітин, таких як фібробласти, ендотеліоцити та перицити, що також є резидентами пухлинного мікрооточення.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[201, 204, 205, 206, 207, 211]

РОЗДІЛ 7

СТРУКТУРИЙ ТА ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ АНАЛІЗ МІКРОКАЛЬЦИФІКАТІВ ІНВАЗИВНОГО ПРОТОКОВОГО РГЗ

Для детального вивчення структури мікрокальцифікатів РГЗ з I групи зразків нами був проведений комплекс морфологічних досліджень, який складався з макроскопічного дослідження, гістохімічного забарвлення мікрокальцифікатів за методом фон Косса та алізариним червоним, сканувальної електронної мікроскопії з рентгенівським мікроаналізом (SEM/EDX), просвічувальної електронної мікроскопії (ПЕМ). Макроскопічне, гістологічне, гістохімічне дослідження мікрокальцифікатів I групи було описано у розділі 3.3, тому у цьому розділі головний фокус уваги зосереджений на сканувальній електронній мікроскопії з рентгенівським мікроаналізом (SEM/EDX) та просвічувальній електронній мікроскопії.

Мікрокальцифікатами вважалися біомінеральні депозити РГЗ, які склалися зі сполук кальцію і їх максимальний розмір (діаметр) не перевищував 1000 мкм (0,1 см). Такий поріг був взятий з-за складності виявлення зразка неозброєним оком при макроскопічному дослідженні [Піддубний, Патологія 2019]. Абсолютна більшість мікрокальцифікатів виявлялася виключно за допомогою гістологічних і гістохімічних методів і розмір цих утворень варіював від 50 до 300 мкм. Більшість мікрокальцифікатів мала структурні пошкодження внаслідок пробопідготовки у ході виготовлення мікропрепаратів.

Сканувальна електронна мікроскопія

SEM зразків РГЗ проводилося шляхом дослідження гістологічних зрізів за розробленою методикою [патент]. При проведенні SEM зразків тканини РГЗ I групи виявило присутність яскравих об'єктів біло-сірого кольору у вигляді округлих структур або фрагментів чи пластинок, що локалізувалися серед пухлинних мас або її стромального компоненту. Біомінеральні депозити мали ознаки руйнування та фрагментації, що виникали внаслідок пошкодження

зразків при виготовленні мікротомних зрізів. Частина округлих об'єктів виявлялася в протокових (можливо, судинних) ложах (рис. 7.1.1 Е).

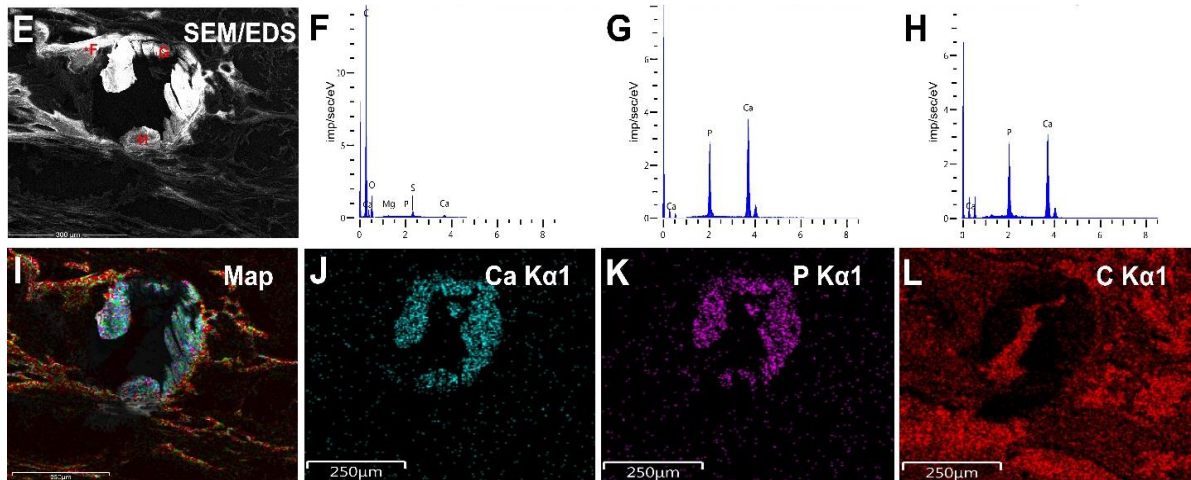


Рисунок 7.1.1. Дослідження тканини раку грудної залози з мікрокальцифікатами (групи I). Е - дослідження тканини РГЗ за допомогою СЕМ. F, G, Н – ЕДС спектри, що відповідають точкам вимірювання аналізу на рисунку Е. І — фізико-хімічне дослідження зразків групи I за допомогою ЕДС-картування тканини РГЗ: бірюзовим позначено іони кальцію (J), фіолетовим – фосфору (K), червоним – карбону (L). Збільшення препаратів вказано у лівому нижньому куті зображення у вигляді маркера.

EDX аналіз мікрокальцифікатів РГЗ

За даними карт розподілу елементів та співвідношенням Ca/P, отриманим зі спектрів EDX в вибраних точках, мінерал депозиту є кальцій-фосфатом апатитного складу. Результат точки F був отриманий з органічного компоненту зразка тканин РГЗ. Розподіл вуглецю по полю сканування має видимі ознак відсутності у місцях локалізації мінералізованих частинок. Це свідчить про екранування кальцифікованими тканинами вуглецевого столика-підложки. За даними EDX аналізу мікрокальцифікатів РГЗ групи I у двох вказаних точках G і Н мали співвідношення Ca/P, яке більш відповідає гідроксиapatиту кальцію, ніж трикальційфосфату (ТСР) навіть без врахування можливих заміщень Са на Mg і Na у гратці апатиту. Всі обрані для EDX аналізу точки характеризуються високим рівнем мінералізації, за винятком точки F, де

низьке співвідношення Ca/P і високий рівень вуглецю, кисню та сірки, що вказують на наявність значної частки органічної речовини (рис.7.1.1 G-L).

У частині виокремлених зразків РГЗ I групи СЕМ показує, що мінеральні відкладення мають будову частинок неправильної форми (30-40 мкм) з грануляцією та наростами, не консолідованими з навколишніми/оточуючими непухлинними тканинами грудної залози (рис. 7.1.2 E). Дрібні нарости на мікрокальцифікатах при великих збільшеннях можна ідентифікувати як кристали. За даними карт розподілу елементів (у вказаних на рис. 7.1.2 E точках) визначено/вбачається/видається, що мінерал депозиту є може бути оксалатом кальцію (рис. 7.1.2 I-L). Більше даних за те, що кальцифіковані частинки можуть представляти собою мінерал-органічні композитні утворення, про що свідчить ЕДС спектр у точці F. ЕДС спектр у точці H вказує на можливість утворення в тканинах РГЗ мінеральних частинок, що не містять кальцію.

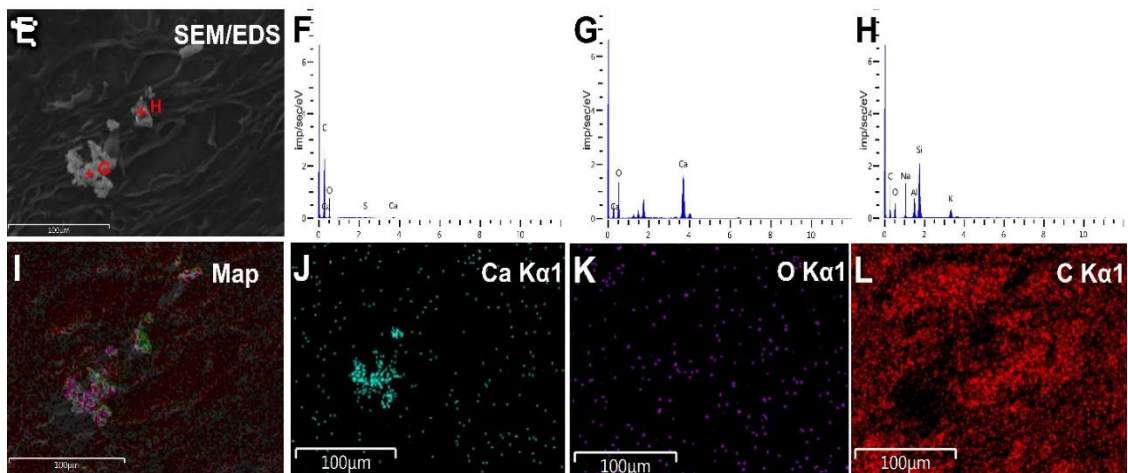


Рисунок 7.1.2. Дослідження тканини раку грудної залози групи I. E – H - дослідження тканини РГЗ за допомогою СЕМ з ЕДС спектрами. Спектри F, G, H відповідають точкам вимірювання на рисунку E. I – L – фізико-хімічне дослідження кальцифікату РГЗ I групи за допомогою ЕДС-картування, бірюзовим позначено іони кальцію (J), фіолетовим – кисню (K), червоним – карбону (L). Збільшення препаратів вказано у лівому нижньому куті зображення у вигляді маркера.

При проведення СЕМ зразків РГЗ з мікрокальцифікатами серед знахідок були виявлені препарати, в яких одночасно знаходилися біомінеральні депозити різного фазового складу (рис. 7.1.3). За результатами EDX аналізу зазначених мікрокальцифікатів у тканині ГЗ спостерігалось одночасне виявлення мікрокальцифікатів апатитної та оксалатної природи (рис. 7.1.3, спектри). Однак мікрокальцифікати мали локалізацію у різних компартментах: депозити апатитної природи розміщувалися в просвіті протоки, а оксалатної природи – в фіброзній тканині.

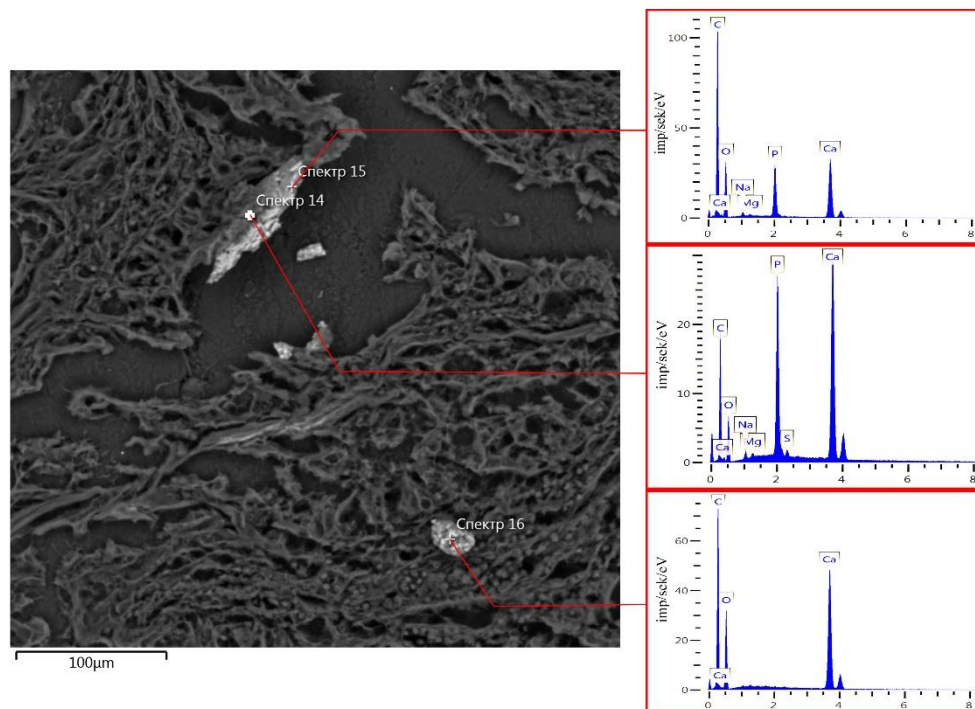


Рисунок 7.1.3 - Дослідження тканини раку грудної залози I групи за допомогою СЕМ з ЕДС. Спектри відповідають точкам вимірювання на рисунджку. Спектр 14 – 15 – гідроксиapatит, спектр 16 – оксалат кальцію.

Скануюча електронна мікроскопія, EDX-спектри, картування та ПЕМ зразків РГЗ групи II ознак відкладення біомінералів не виявило (рис. 7.1.4).

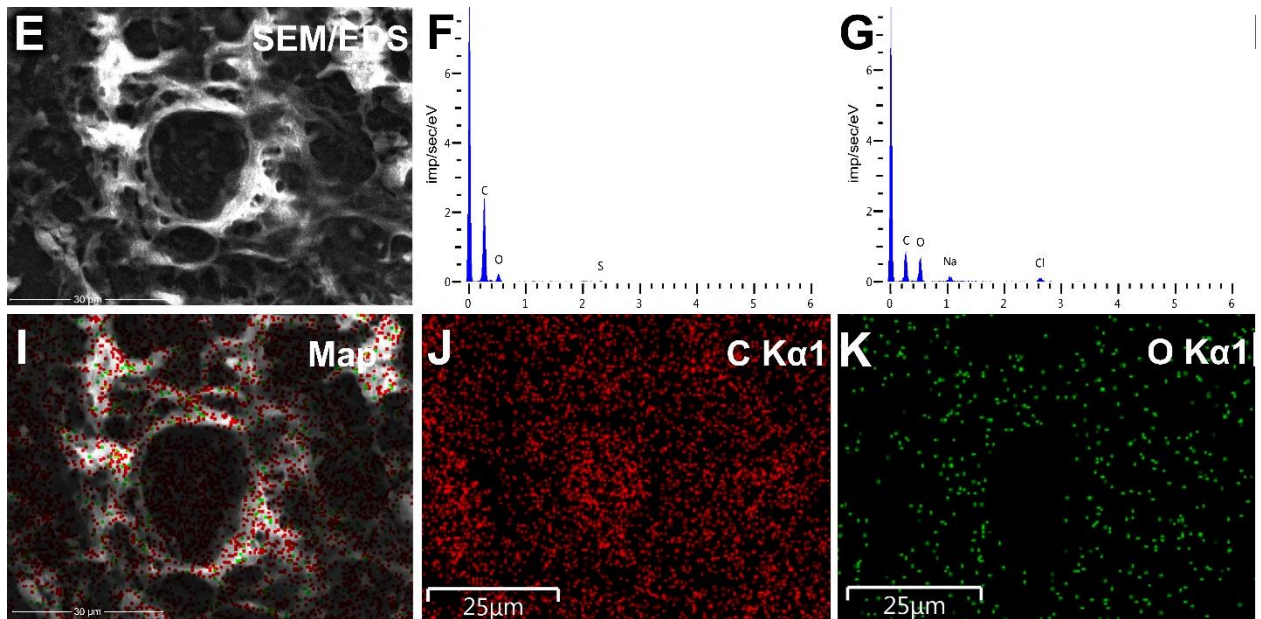


Рисунок 4. Дослідження тканини раку грудної залози без мікрокальцифікатів (групи II). Е - дослідження тканини РГЗ за допомогою СЕМ. F, G – ЕДС спектри, що відповідають точкам вимірювання аналізу на рисунку Е. І – фізико-хімічне дослідження тканини РГЗ II групи за допомогою ЕДС-картування: червоним позначено іони карбону (J), зеленим – кисню (K). Збільшення препаратів вказано у лівому нижньому куті зображення у вигляді маркера.

Просвічувальна електронна мікроскопія (ПЕМ)

Мікроструктури кальцифікатів РГЗ та відповідна електрограма показані на ПЕМ виявили, що зразки є однофазними та мають полікристалічну структуру. Окремі монокристалічні частинки кальцифікатів РГЗ мали розміри від 3 нм до 20 нм, найбільш переважаючим розміром був 9 нм.

Нанокристали кальцифікатів РГЗ трансформувалися в полікристалічні та механічно стійкі агломерації розміром 100 – 300 нм. Явища рекристалізації з помітним збільшенням розмірів окремих компонентів не було виявлено.

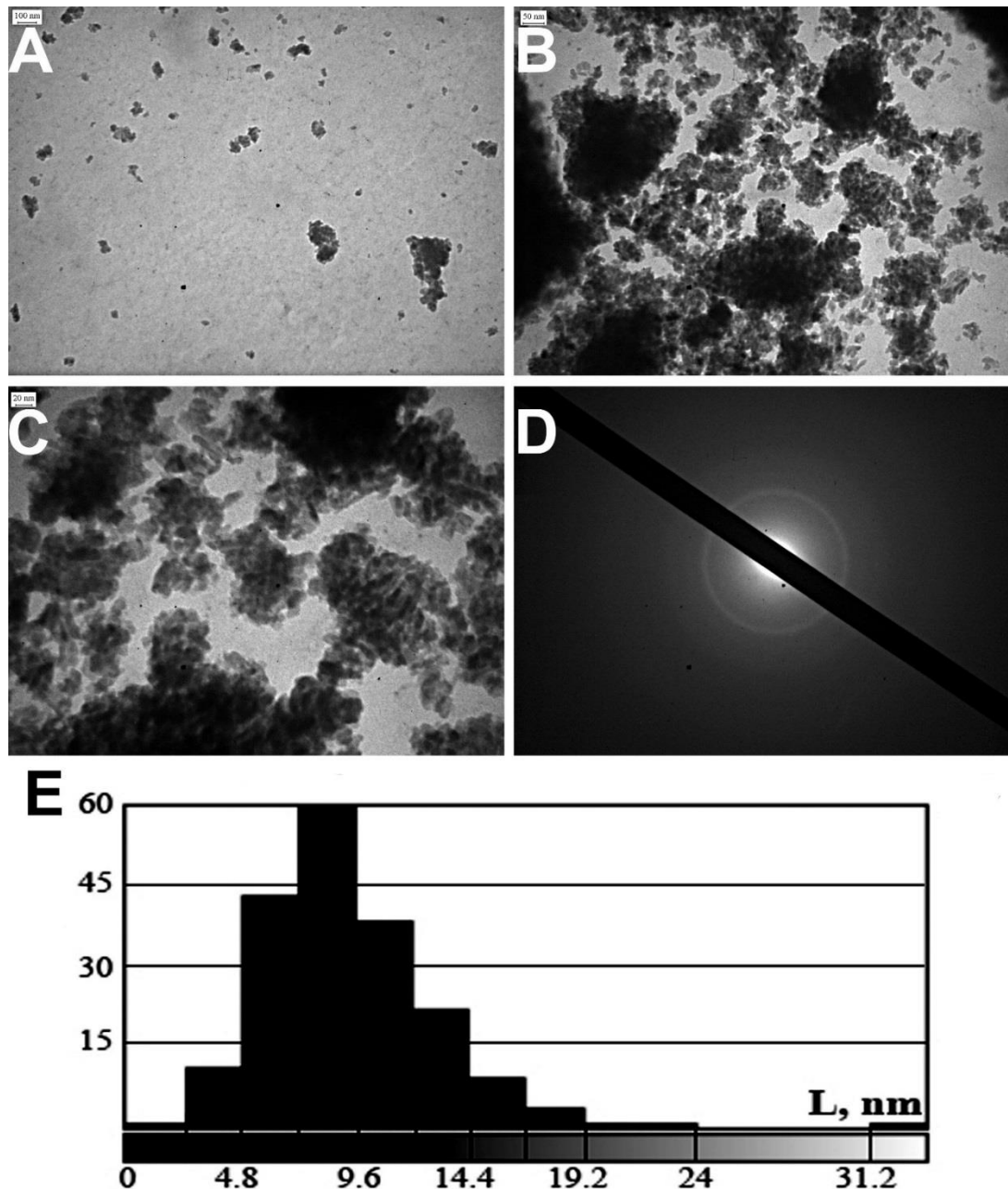


Рисунок 7.2.1 – Просвітлювальна електронна мікроскопія зразків РГЗ. А, В, С – кристали мікрокальцифікатів, D – картина електронної дифракції, E – гістограма розподіду розмірів кристалічних наночастинок. Вісь X – розмір наночастино, вісь Y – кількість наночастинок.

Отже, за співвідношенням Ca/P (і наявності слідів органічної речовини за результатами елементного картування) мікрокальцифікати пухлинної тканини РГЗ відповідають зрілому гідроксиапатиту. Також у частині зразків РГЗ були виявлені біомінеральні утворення, які не мали у своєму складі фосфору і за рівнем вмісту кальцію відповідали оксалатам.

Одночасна наявність оксалатів та гідроксиапатитів кальцію свідчить про те, що біомінеральні депозити мають різні умови для формування мікрокальцифікатів. Це непрямо підтверджується різною просторовою локалізацією мікрокальцифікатів.

ПЕМ з ЕД показала деякі структурно-морфологічні особливості кристалів апатиту раку молочної залози, які не були виявлені іншими методами. За даними ПЕМ, кристалічні наночастинки були полідисперсними (мали різні розміри) з незначними коливаннями розмірів (3-20 нм). Нанокристали кальцифікатів раку молочної залози утворювали полікристалічні механічно стійкі агломерати розміром 100 – 300 нм.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[201, 205-207]

РОЗДІЛ 8

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) у 2020 році у всьому світі було діагностовано 2,3 мільйона жінок з РГЗ та 685 000 смертей [2, 5]. Вживаність при РГЗ протягом щонайменше 5 років після встановлення діагнозу коливається від понад 90% у країнах з високим рівнем доходу, до 66% в Індії та 40% у Південній Африці. За даними ВООЗ смертність за віком від РГЗ в країнах з високим рівнем доходу впала на 40% з 1980-х до 2020 року. Країни, яким вдалося знизити смертність від РГЗ, змогли досягти щорічного зниження смертності від даної патології на 2-4% на рік. Якщо досягти щорічного зниження смертності в усьому світі на 2,5% на рік, то між 2020 і 2040 роками можна буде уникнути 2,5 мільйонів смертей від РГЗ [2, 5, 142]. Отже, незважаючи на певні успіхи у профілактиці та лікуванні РГЗ у розвинених країнах, ця хвороба залишається важливою медичною і соціальною проблемою у всьому світі.

За даними Національного канцер-реєстру України показником захворюваності жіночого населення України РГЗ зберігає тенденцію до зростання. В 2020 р. в Україні на РГЗ захворіли 12164 і померло 5156 жінок, т.ч на кожні 10 нових випадків РГЗ зареєстровано 4 смерті. Пікові значення показника захворюваності жінок на РГЗ зареєстровані у вікових групах 65-74 років, смертності – у вікових групах 65-84 роки [143, 144, 145, 146, 147, 148]. За даними The Global Cancer Statistics за 2020 рік виділяють 10 країн із найбільшою кількістю захворюваності та смертності у жінок від раку грудної залози. Серед перших країн світу виділяють: Бельгію, Нідерланди, Люксембург, Францію, Данію, Австралію, Нову Зеландію та Фінляндію [149].

Порівняльна характеристика епідеміологічних показників в Україні та Сумській області показує деякі особливості, які заслуговують уваги. Так, за результатами розподілу поширеності РГЗ в Україні за областями (на 100 тис. жіночого населення) у період 2015-2020 років найбільша кількість випадків

реєструється у м. Київ, Кіровоградській, Запорізькій, Сумській, Харківській та Херсонській областях, а найменші рівні показників захворюваності у Чернівецькій, Тернопільській, Рівненській, Івано-Франківській та Закарпатській областях. Такий розподіл більше свідчить про роль екологічних факторів на загальнодержавному рівні, оскільки відомо, що рівень забруднення навколишнього середовища нижче на Заході України в силу багатьох причин (важка та хімічна промисловість і пов'язане з ними забруднення води, ґрунту і повітря; збереженість природнього потенціалу, рекреаційні та природоохоронні зони) [150].

Загалом до 2018 року відбувалося зростання показників захворюваності на РГЗ як у Сумській області, такі Україні. При чому найвища точка зростання показника на рівні держави припадала на 2018 рік (77,5 випадків на 100 тис. жіночого населення), а для Сумської області ріст продовжувався і в 2019 році (87,20 випадків на 100 тис. жіночого населення). З іншого боку, найнижчі показники захворюваності в Україні та Сумській області спостерігалися у 2020 році (67,1 випадків на 100 тис. жіночого населення та 68,5 випадків на 100 тис. жіночого населення відповідно), різниця між показниками є найменшою за всі роки спостережень. Цей феномен легко пояснюється стартом пандемії респіраторного вірусу SARS-Cov-2 (COVID-19), яка суттєво змінила пріоритети медичної галузі у більшості країн світу, що й спричинило зниження кількості виявлених випадків РГЗ.

Високий рівень захворюваності на РГЗ впродовж останньої декади у Сумській області також обумовлюється таким важливим фактором як покращення лабораторно-інструментальних методів діагностики цього та інших онкологічних захворювань. За останні роки було запроваджено імуногістохімічне дослідження зразків пухлин РГЗ для всіх пацієнтів, широко впроваджені трепанобіопсії ГЗ, придбано сучасний маммограф, стали широко доступними комп'ютерні та магнітнорезонансні томографи, з'явився доступ до молекулярно-генетичного тестування зразків пацієнтів, покращилося фінансування онкологічної галузі через механізми Національної служби

здоров'я України (НСЗУ). Непоганий рівень діагностики РГЗ у Сумській області підтверджується аналізом стадійного розподілу РГЗ, що був вперше виявлені за 2015-2020 роки. Так, аналіз даних показав, що в Сумській області більше випадки виявлення РГЗ на ранніх стадіях перевищують загальнодержавні показники, а з іншого боку – пацієнтів з III та IV стадією менше: у жінок, які вперше звернулися складала для I-II стадії – 62,6%, стадії – 14,7%, – 8,4% та в 2% – стадію не було визначено по Україні, та для I-II стадії – 72,7%, III стадії – 4,78%, IV стадії – 3,8% та в 4,77% – стадію не було визначено для Сумської області.

Проаналізувавши дані розподілу РГЗ за віковими показниками у період 2015-2020 роки, встановлено що пікові значення поширеності захворювання на РГЗ спостерігаються у 70-74 років ($168,29 \pm 7,59$ випадків на 100 тис. жіночого населення), що співпадає з загальноукраїнськими та світовими тенденціями [149].

При деталізації епідеміологічних показників поширеності РГЗ у Сумській області були встановлені наступні особливості. До найвищих показників захворюваності на РГЗ серед районів Сумської області належать м. Суми ($81,62 \pm 10,71$), Путивльський ($79,35 \pm 16,76$) та Роменський ($78,52 \pm 11,46$). Найнижчий рівень захворюваності був у Липово-Долинському ($50,4 \pm 4,3$), Середино-Будському ($46,83 \pm 10,32$) та Білопільському ($41,93 \pm 11,31$) районах. Проаналізувавши дані питомої ваги онкохворих на РГЗ у районах Сумської області, які прожили 5 та більше років після встановлення діагнозу за 2015-2020 роки, можна виділити райони з найвищими показниками - Буринський ($70,9 \pm 1,0$), Липоводолинський ($66,9 \pm 1,2$) та Середино-Будський ($66,6 \pm 1,3$), інші райони характеризувались середніми показниками.

Вплив на статистичні показники у районних центрах здійснюється через різні можливості доступу до сучасного лабораторного і діагностичного обладнання, кваліфікованих вузькопрофільних спеціалістів, кількості населення. Наприклад, у районах з невеликою кількістю населення кілька додаткових виявлених/пропущених випадків можуть суттєво змінити

статистичний показник. Окрім того, на високі та середні показники виживаності у хворих на РГЗ у Сумській області впливає такий традиційний фактор, як встановлення діагнозу на I-II стадіях і попередження таким чином ускладнень - метастазування у віддалені органи та лімфатичні вузли. Отже, рання діагностика РГЗ важлива для термінів виживаності у таких хворих.

На основі проведеного бібліометричного аналізу доступної літератури, що міститься в наукометричній базі даних Scopus за період 1967-2022 рр було виявлено 924 публікацій за ключовими словами «рак грудної залози», «кальцифікація». Можна сказати, що тематика патологічної біомінералізації РГЗ зустрічає постійний інтерес дослідників впродовж доволі значного проміжку часу. Впродовж всього періоду досліджень змінюються інструменти і методики наукових пошуків, але кількість робіт, присвячених мікрокальцифікації ГЗ має стабільну тенденцію до зростання [151]. За допомогою інструменту побудови та візуалізації бібліометричних мереж VOSviewer нами було простежено хронологію етапності наукових досліджень патологічної кальцифікації ГЗ. Так, основні історичні етапи досліджень цієї наукової проблематики змінювалися від радіологічних і гістологічних методів дослідження – до дослідження біомаркерів пухлинної прогресії РГЗ та прогностичної оцінки РГЗ в залежності від метастазування та виживаності.

Залишаються актуальними доволі численні спроби використання мікрокальцифікатів РГЗ у діагностичних цілях через їхні радіологічні, клінічні, гістологічні та фізико-хімічні особливості [152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161].

Вважається, що патологічна біомінералізація ГЗ у вигляді мікрокальцифікатів відіграють важливу роль у розвитку патологічного процесу та впливають на гірший прогноз та метастазування. Їх присутність у тканині РГЗ є критерієм для визначення стадії захворювання та ранньої і диференційної діагностики РГЗ [15, 16, 17].

Діагностичне значення мікрокальцифікатів грудної залози залишається у полі пильної уваги вчених багато років. Мікрокальцифікати РГЗ були вперше

ідентифіковані як важливі діагностичні ознаки злоякісних пухлин ще у 1951 році [162]. Нині, нова хвиля наукового інтересу до мікрокальцифікатів ГЗ піднялася завдяки клінічній радіології, де їх наявність є важливою діагностичною ознакою. Так, згідно останньої 5 –ї редакції стандартизованої системи для оцінювання патології грудної залози методами мамографії, ультразвуку та МРТ (BI-RADS (The Breast Imaging Reporting and Data System), мікрокальцифікати мають окремий розділ [17]. Мікрокальцифікати є особливо цінними для діагностики непальпованих пухлин та початкових стадій протокового раку ГЗ [163, 164]. Звичайно, сама наявність мікрокальцифікатів надає тільки загальну інформацію, оскільки що лікарі діагностують біомінеральні депозити як у випадку злоякісних, так і доброякісних пухлин ГЗ. Для більш ясної клінічної діагностики пухлин грудної залози необхідна інформація про радіологічну характеристику, просторову локалізацію, хімічний і фазовий склад мікрокальцифікатів. Радіологічна характеристика мікрокальцифікатів згідно BI-RADS®5th редакції дозволяє виділити наступні фенотипи мікрокальцифікатів: «доброякісні» та «підозрілої морфології». Зазвичай, фенотипічно «доброякісні» мікрокальцифікати включають в себе наступні типи: судинний, грубий або типу поп-корну, типу великих стрижнів, округлий, дугоподібний, дистрофічний, молочний (або кальцієвий), шовний. У найновішій редакції BI-RADS®, фенотип мікрокальцифікатів «підозрілої морфології» співвідноситься з такими морфологічними типами, як аморфний, грубим-гетерогенний, тонким плеоморфний, тонкий лінійний та тонкий лінійно-розгалужений [17].

Звісно, що радіологічна форма мікрокальцифікатів різних органів є наслідком її морфології [165]. Наприклад, кальцифікація оболонки кістки призводить до утворення кільцевих або дугоподібних кальцифікацій і така форма є ознакою доброякісної патології [166]. З іншого боку, лінійні кальцифікації вздовж протоків, розгалужень залоз, залозистих часточок грудної залози є високоризиковими щодо злоякісних пухлин [17]. Також

підозрілими щодо злоякісної природи є пухлини з кластерами кальцифікації (5 мікрокальцифікатів на площу 1 см²).

Фізико-хімічний та фазовий склад мікрокальцифікатів ГЗ активно досліджується впродовж останніх десятиліть [167, 168]. Встановлено, що основними кристалічними фазами мікрокальцифікатів ГЗ є оксалат кальцію (I тип кальцифікації) та гідроксиапатит (II тип кальцифікації) [169, 170]. Оксалат кальцію виробляється апокриновими клітинами грудної залози [171]. Вони в основному пов'язані з доброякісними кістозними змінами, але також можуть бути асоційованими з раком грудної залози. Оксалат кальцію не може метаболізуватися клітинами ссавців і є нові свідчення того, що вплив оксалату може впливати на епітеліальні клітини, викликаючи клітинні та генетичні зміни [172]. Andres M. та співавтори встановили, що оксалати кальцію пов'язані, як з інвазивними карциномами, так і з ураженнями *in situ* [173]. Оксалати клітин індукують зміни в нормальних епітеліальних клітинах молочної залози, сприяючи трансформації клітин молочної залози від нормальних до пухлинних клітин [173]. Це повністю співпадає із результатами даного дослідження, бо ми виявили присутність оксалатних структур у ділянках інтактної тканини ГЗ. Тоді як саме у пухлинній тканині не було виявлено жодного оксалатного конкременту. Присутність мікрокальцифікатів оксалатної природи у тканині РГЗ може бути поясненим через розвиток злоякісних пухлин на фоні передіснуючої доброякісної патології, спадком якої є мікрокальцифікати, що складаються з оксалату кальцію. Одночасна наявність гідроксиапатитних та оксалатних біомінералів у тканині інвазивного РГЗ ускладнює використання кристалічно-фазової різниці патологічних біомінералів для променевої неінвазивної діагностики.

Сполуки фосфату кальцію легше розпізнаються під час гістології та частіше асоціюється зі злоякісним новоутвореннями ГЗ [174]. Згідно результатів рентгенівської дифракції, СЕМ з енерго-дисперсивною спектроскопією, ПЕМ з електронною дифракцією та розподілу співвідношення Ca/P на карті вибраних точок рентгенівського мікроаналізу

спектру (SEM) у всіх зразках РГЗ І групи було встановлено наявність фосфату кальцію у формі зрілого гідроксиapatиту. До речі, подібні результати були встановлені для злоякісних пухлин яєчників, простати, щитоподібної залози [175]. У значній частині випадків у структурі досліджуваних гідроксиapatитів за умов різної патології часто зустрічаються карбонатні заміщення [аорта, ДГПЗ]. Цікаво, що зміна рівнів і вмісту карбонатів в гідроксиapatиті може впливати на ріст клітин раку молочної залози [20]. Дослідження показали, що РГЗ з мікрокальцифікатами частіше асоційований з інвазією лімфатичних вузлів [176]. Отже ці дані дозволяють припустити, що мікрокальцифікати грудної залози мають гірший прогноз у хворих з РГЗ [19].

Важливим результатом дисертаційного дослідження є виявлення 6 випадків поєднання мікрокальцифікатів оксалатної природи поряд з апатитними біомінеральними депозитами. Спільне знаходження мікрокальцифікатів гідроксиapatитного і оксалатного фазового складу у частині випадків інвазивного раку ГЗ на перший погляд знижує діагностичний потенціал патологічної біомінералізації. Проте просторова локалізація оксалатних мікрокальцифікатів у нашому дослідженні завжди відповідала ділянкам тканини без пухлинного росту. Як правило, це були просвіти і протоки розширених залоз, сполучна і жирова тканина грудної залози. Одночасна наявність оксалатів кальцію у цій групі свідчить про те, що біомінеральні депозити мають різні умови для формування мікрокальцифікатів. Очевидно, що розвиток злоякісних пухлин ГЗ відбувається на фоні передіснуючої доброякісної патології, спадком якої є мікрокальцифікати, що складаються з оксалату кальцію.

Отже, незважаючи на одночасне виявлення (несподівані знахідки) обох фаз мікрокальцифікатів у тканині РГЗ, принципових розподіл на «доброякісні» оксалатні та злоякісні «гідроксиapatитні» біомінеральні депозити не порушується.

Мікрокальцифікати гідроксиapatитної природи легко виявляються при рутинному гістологічному дослідженні, оскільки забарвлюються в темно-

синій колір. Мікрокальцифікати, які складаються з оксалату кальцію, мають янтарно-золотистий колір. Для виявлення кристалів оксалату кальцію у деяких роботах повідомляють про застосування поляризованого світла [177, 178]. В той же час, мікрокальцифікати оксалатної будови мають сумнівні реакції фон Косса та з антитілами проти ОПН. Для гідроксиапатиту обидва дослідження є однозначно позитивними. Гістохімічне забарвлення з алізариновим червоним добре забарвлює обидва типи мікрокальцифікатів. Ґрунтуючись на результатах дисертаційного дослідження та попередніх роботах ми порівняли діагностичні ознаки обох кристалічних форм мікрокальцифікатів (табл. 8.1). Зазначена інформація може мати практичну цінність для клініцистів, зокрема патологів.

Таблиця 8.1 – Диференційна діагностика мікрокальцифікатів РГЗ

Ознака	НАР	ОхСа
Локалізація	Пухлинні маси, судини, некротичні маси	просвіт залоз, детрит у протоках
Забарвлення гематоксилін- еозином	темно-синє	янтарне
Світіння у поляризованому світлі	-	+
Реакція фон Косса	+	сумнівна
Забарвлення алізариновим червоним	+	+
ІГХ з антитілами проти ОПН	+	сумнівна
Кристалічна форма	гексагональна	прямокутні кристали, паралелепіпедна

Встановлення співвідношення гідроксиапатитних та оксалатних біомінералів з злоякісною та доброякісною патологією ГЗ є цінною діагностичною ознакою, яка може бути використана у практичній діяльності (рис. 8.1). Диференціації мікрокальцифікатів ГЗ за фазовою ознакою відкриває можливість визначення лікувальної та оперативної тактики пацієнток. У медичній практиці наявність мікрокальцифікатів вважається несприятливою

ознакою і часто схиляє онкохірургів до радикального оперативного лікування. Ідентифікація фізико-хімічної природи мікрокальцифікатів ГЗ дозволить уникнути непотрібного радикального лікування. Цікавою ідеєю є перспектива розробки неінвазивного інструментального підходу до визначення фазового складу мікрокальцифікатів ГЗ *in vivo*, що дозволило б зробити діагностику безболісною і неінвазивною.

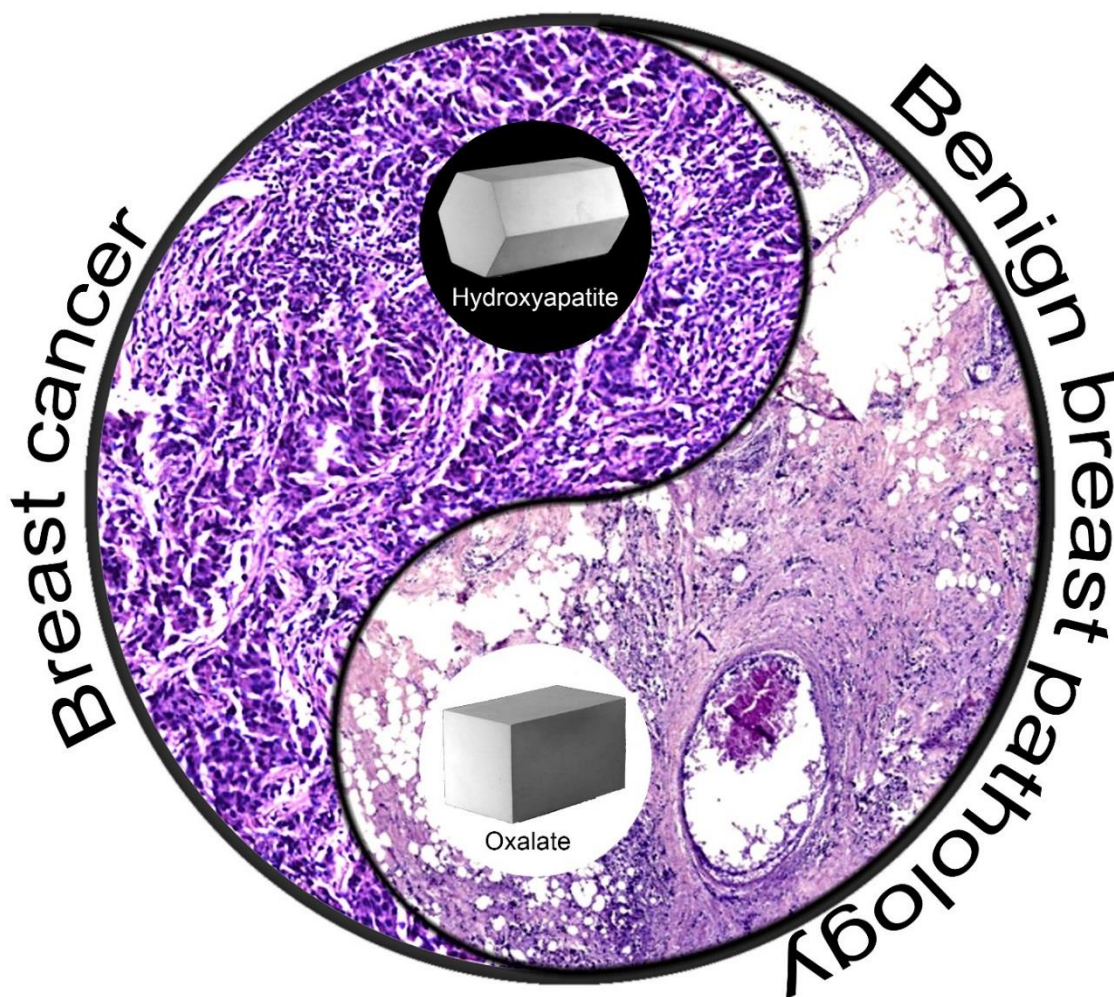


Рисунок 8.1 – Схема співвідношення гідроксиапатитних та оксалатних біомінералів з злоякісною та доброякісною патологією ГЗ

Прогностичне значення мікрокальцифікатів РГЗ також активно досліджується та дискутується [179, 180]. Існує кілька досліджень, що обґрунтовують асоціацію між мікрокальцифікатами РГЗ і несприятливим прогнозом [32]. Визначення імуногістохімічної експресії рецепторів Er, Pr та

білка Her-2-neu є обов'язковим для пацієток з РГЗ згідно стандартів NCCN (National Comprehensive Cancer Network) для визначення лікувальної тактики [181]. Наприклад, E.Y. Chae та ін. повідомляє про асоціацію естроген-позитивного статусу та наявності/відсутності кальцифікації з гіршим прогнозом для пацієнтів [182].

Тому для оцінки прогностичного значення мікрокальцифікатів ми провели ретроспективний аналіз результатів ІГХ дослідження рецепторів Er, Pr та білка Her-2-neu у біопсіях РГЗ з наявністю мікрокальцифікатів та без них. У дисертаційному дослідженні був ретроспективно проаналізований масив архівних даних імуногістохімічного дослідження біопсій РГЗ, які проводилися на базі Наукового центру патоморфологічних досліджень кафедри патологічної анатомії СумДУ впродовж 2012-2018 років (469 зразків).

При порівнянні зразків біопсій пацієток з РГЗ виявлено відсутність статистично достовірної різниці імуногістохімічної експресії рецепторів Er, Pr та білка Her-2-neu у випадку наявності (група ІА) та відсутності (група ІА) мікрокальцифікатів.

Рецидивний РГЗ може бути у вигляді двох форм: з віддаленими метастазами (переважно кістки, головний мозок, печінка, легені та віддалені лімфатичні вузли) та локорегіонарний рецидив (поширення у грудну залозу, грудну стінку чи регіональні лімфатичні вузли). Більш ніж у 50% пацієнтів першим місцем утворення віддалених метастазів є кістки, потім легені (17%), мозок (16%) і печінка (6%) [183]. Метастази в кістки є найбільш поширеним та важковиліковним ускладненням РГЗ [184]. Зрештою, у 70% пацієнтів з метастатичним РГЗ спостерігається віддалений кістковий рецидив під час перебігу хвороби [185, 186]. РГЗ маже завжди призводить до загибелі пацієнтів впродовж 5-10 років, при чому ця статистика не змінилася за останні 2–3 десятиліття [186].

Цікаво, що естроген-позитивний РГЗ має достовірно вищий показник метастазування до кісток (>87%) у порівнянні з естроген-негативними пухлинами (<56%) [20, 22, 53–55]. Іншим фактом, який заслуговує на увагу, є

те, що кісткові метастази РГЗ відносяться до остеолітичних. Остеолітичний фенотип метастазів РГЗ спричинюється надмірним опосередкованим руйнуванням кістки остеокластами [184].

Сьогодні існує розуміння того, що вирішальну роль у метастазуванні РГЗ до кісток відіграє механізм епітеліально-мезенхімальної трансформації. Можливі трансформації між пухлинними клітинами та клітинами кісткової стромы, а також диференціація мезенхімальних стовбурових клітин у клітини остеобластичного фенотипу (остеобластів та остеокластів) очевидно є вирішальними для розвитку остеотропних метастазів [6]. Такий механізм пояснює наявність остеолітичних метастазів при РГЗ через активацію остеокластів, а не прямого фізичного руйнування кістки пухлинними клітинами [7, 8]. Важливо зрозуміти, що активуються остеокласти кісткової тканини при взаємодії з пухлинними клітинами РГЗ, які здатні продукувати відповідні для цього фактори росту [9, 10]. У свою чергу, руйнування кісткового матриксу вивільняє фактори росту, які стимулюють ріст ракових клітин [11]. Цей процес називають «порочним колом кісткових метастазів» [188].

Раніше була опублікована серія робіт, у яких досліджувалося зв'язок остеотропності метастазів раку передміхурової залози (РПЗ) з наявністю патологічної біомінералізації в простаті у вигляді простатолітів [189]. Оскільки ГЗ займає друге місце за частотою метастазування до кісток після РПЗ та часто містить ознаки патологічної біомінералізації у вигляді мікрокальцифікатів, то нами було проведене поглиблене ІГХ дослідження остеобластичних маркерів з метою визначення метастатичного потенціалу РГЗ з мікрокальцифікатами до кісткової тканини.

При проведенні ІГХ дослідження тканини РГЗ застосовували панель наступних маркерів для визначення остеобластичного фенотипу пухлинних клітин РГЗ: антитіла проти OPN, OPG, SPARC, RANKL.

Остеопонтин – невеликий за масою білок, який бере активну участь у розвитку та формоутворенні кісток та процесах патологічної біомінералізації

судин [12]. З огляду цієї функціональної особливості, OPN завжди можна виявити у вогнищах (фокусах) кальцифікації, цей білок є чітким і раннім маркером біомінералізаційних процесів. Вважається, що надмірна експресія OPN сприяє інвазії пухлини в лімфатичні судини [190]. Також є повідомлення, що висока експресія OPN асоційована зі зниженою загальною виживаністю пацієнтів [191].

Середній показник експресії OPN у тканині РГЗ з біомінералізацією ($91,745 \pm 3,22$) вище, ніж у пухлинній тканині контрольної групи ($76,62 \pm 3,26$) з достовірною різницею даних між цими показниками за критерієм Стьюдента ($p < 0,01$). (рис. 8.2).

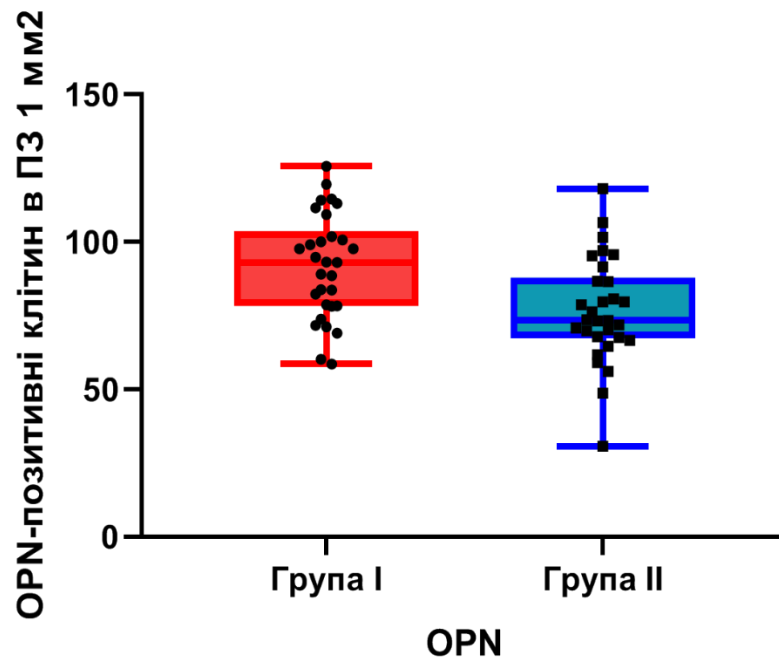


Рисунок 8.2 – ІГХ дослідження експресії OPN у тканині РГЗ досліджуваних груп. Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, $p < 0,001$

OPN забарвлює як цитоплазму клітин (в основному, виробників цього білка), так і позаклітинних структур – поверхні кальцифікатів, волокон, місць формування біомінералів. Загалом, результати ІГХ дослідження тканини РГЗ з мікрокальцифікатами збігається з численними свідчення про безпосередню

участь OPN у процесах формування і розвитку патологічної біомінералізації [10-12]. Але участь OPN у процесах карциногенезу раку грудної залози очевидно впливає на високий рівень імуногістохімічної експресії також і в групі порівняння зразків РГЗ без мікрокальцифікатів. Теоретично це ускладнюватиме застосування OPN як діагностичного маркера для РГЗ.

У тканині РГЗ з мікрокальцифікатами було виявлено вищий рівень імуногістохімічної експресії OPN. Зважаючи на відомий протуморогенний його ефект, це має потенційне негативне прогностичне значення на прогресію РГЗ. Однак залученість OPN у процеси карциногенезу РГЗ очевидно впливає і на високий рівень його імуногістохімічної експресії в групі зразків РГЗ без мікрокальцифікатів.

Таким чином було виявлено достовірно вищий рівень експресії рецепторів OPN у I групі, чим у зразках групи РГЗ без біомінеральних включень, що може свідчити про залежність даного маркера від присутності мікрокальцифікатів, розвитку та регуляції остеобластогенезу та формуванню біомінеральних включень.

При проведенні ІГХ дослідження з антитілами проти OPG метою було оцінити ступінь забарвлення його у пухлинних клітинах та зв'язку з поверхні біомінеральних депозитів. Позитивна реакція проявлялася через цитоплазматичну локалізацію забарвлення у більшості пухлинних клітин. Інтенсивність імуногістохімічної реакції варіювала від низької до помірно-інтенсивної, але у порівнянні з OPN, пухлинне клітинне мікрооточення взаємодіяло з OPG слабо. Кількість позитивно забарвлених клітин запального інфільтрату та строми була незначною, проте внутрішньопухлинні ендотеліоцити демонструють високий рівень експресії OPG у порівнянні з нормальними ендотеліоцитами. Аналогічні результати експресії OPG повідомлялися раніше [192]. Явища фонового забарвлення відмічалися у ділянках ушкодження та вторинних змін пухлинної тканини, що розцінювалося як артефакт. У нашому дослідженні було виявлено статистично достовірну різницю між показниками експресії OPG зразків тканини групи

РГЗ з мікрокальцифікатами та без мінеральних включень ($p < 0,01$): у групі РГЗ з мікрокальцифікатами середнє значення OPG-позитивних клітин $84,88 \pm 3,73$, показник II групи склав $55,24 \pm 3,48$ у одиниці полі зору (рис. 8.3).

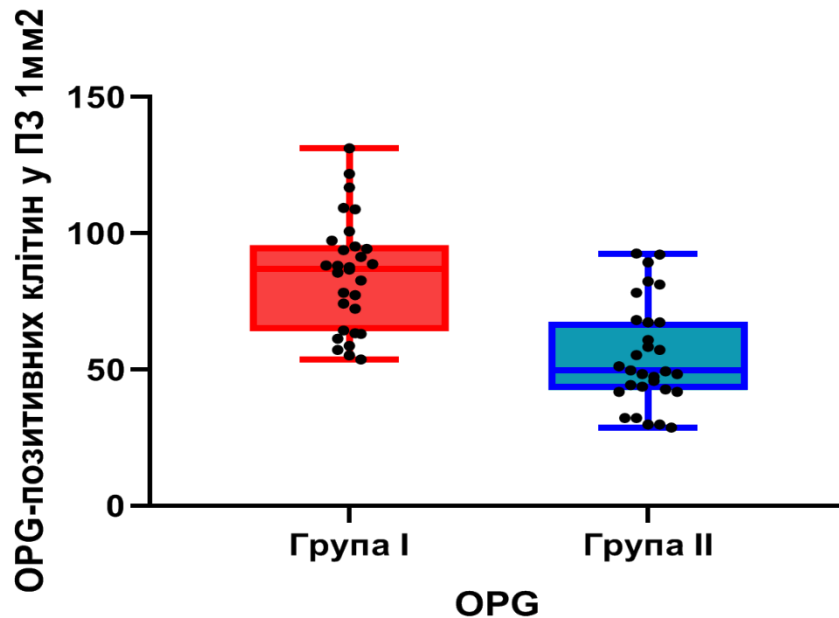


Рисунок 8.3 – ІГХ дослідження експресії OPG у тканині РГЗ досліджуваних груп. Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, $p < 0,01$

Таким чином, нами було виявлено достовірно нижчий середній показник рівня експресії OPG у зразках тканини РГЗ без біомінеральних депозитів, у порівнянні з I групою зразків, але в обох досліджуваних групах експресію OPG можна оцінити як високу, що більше свідчить про залученість цього протеїну до процесу патологічної біомінералізації за умов РГЗ.

Відомо, що роль OPG полягає в інгібуванні остеобластогенезу та резорбції кісткової тканини [193, 194]. Цей ефект може виникати при поєднанні OPG та RANKL, при цьому утворюється система, яка підтримує цілісність скелетних тканин через дію канонічного сигнального шляху Wnt [195]. Очевидно, що для дисбалансу даної системи достатньо зменшення рівня OPG, або підвищення рівня циркулюючого RANKL. За умов метастазування, при проліферації кісткової тканини пухлинні клітини порушують

збалансований цикл ремоделювання кістки через секрецію білка, залежного від паратироїдного гормону та різних інтерлейкінів, які стимулюють підвищення рівня експресії RANKL. RANKL розпізнає та зв'язується з рецептором RANK на остеокластах і їх попередниках, змушуючи їх до подальшої диференціації, резорбції кістки [196]. У нашому дослідженні при порівнянні рівнів експресії RANKL у тканині РГЗ не було виявлено достовірної різниці між групою I та групою II ($p > 0.05$) (рис. 8.4). Зазначені результати можуть свідчити про обмежене значення RANKL у взаємодії мікрокальцифікатів з тканиною РГЗ та макроорганізмом. Про це непрямо свідчать дані про відсутність ефекту від інгібітора RANKL (деносумаб) у попередженні метастазів до кісток як у пременопаузальних, так і постменопаузальних жінок [197].

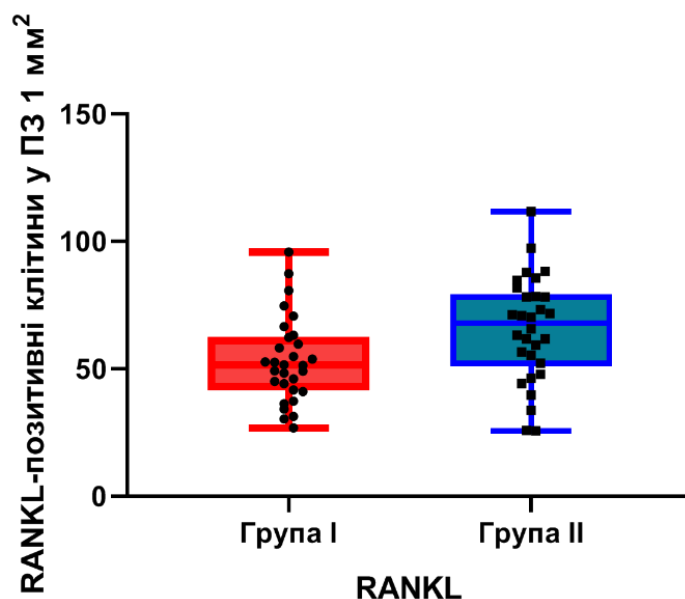


Рисунок 8.4 – ІГХ дослідження експресії RANKL у тканині РГЗ досліджуваних груп. Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, $p > 0,05$.

SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) або остеонектин — це кислий глікопротеїн позаклітинного матриксу, який відіграє важливу роль у мінералізації кісток, взаємодії між клітиною та матриксом та зв'язуванні

колагену. Остеонектин також збільшує виробництво та активність матричних металопротеїназ, функції, важливої для проникнення ракових клітин у кістку. Додаткові функції остеонектину, які використовуються пухлинними клітинами, включають сприяння ангіогенезу, їх проліферації та міграції. Також відомо про надмірну експресію остеонектину при деяких видах раку, таких як РГЗ, РПЗ, колоректального раку та раку підшлункової залози [198]. У нашому дослідженні була виявлена помірна та низькоінтенсивну експресію глікопротеїну SPARC у цитоплазмі пухлинних клітин РГЗ. Прямого зв'язку або тропності SPARC безпосередньо до біомінеральних депозитів виявлено не було. Глікопротеїн SPARC активно експресувався у клітинах пухлинного мікрооточення, переважно у лімфоцитах запального інфільтрату. Помірний рівень фонового забарвлення ДАБ був присутній у більшості препаратів, більше пов'язаного із вторинними змінами у пухлині. Досліджуючи експресію SPARC між двома групами було виявлено достовірну статистичну різницю ($p < 0,05$) через вищий рівень експресії SPARC у зразках РГЗ з мікрокальцифікатами (рис. 8.5).

Отримані результати можуть свідчити, що експресія SPARC має залежність від наявності у тканині біомінеральних включень та може слугувати розвитку остеобластогенезу та регуляції фіброзу та розвитку хронічного запалення у тканині пухлини. До того ж, ген SPARC було внесено до числа генів, пов'язаних з метастазуванням РГЗ на основі детального молекулярно-генетичного дослідження тваринних експериментальних моделей метастатичного РГЗ [199].

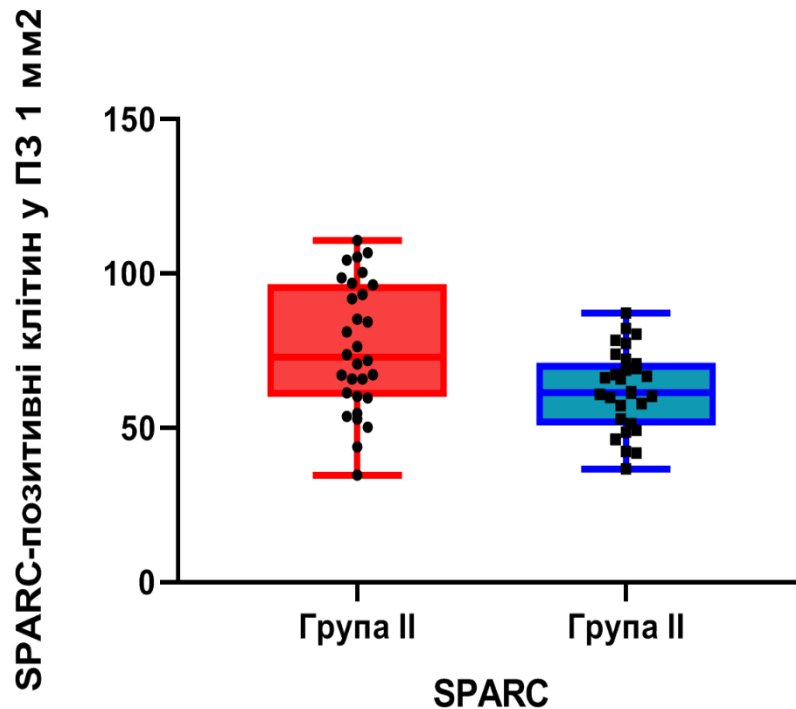


Рисунок 8.5 – ІГХ дослідження експресії SPARC у тканині РГЗ досліджуваних груп. Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, $p < 0,05$

Таким чином, порівняння результатів ІГХ дослідження остеобластичних маркерів продемонстровало статистично достовірну вищу експресію маркерів OPN, OPG, SPARC ($p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$) у тканині РГЗ з мікрокальцифікатами. Проте, пухлинна тканина не демонструвала достовірної різниці експресії RANKL ($p < 0,05$) між групами досліджуваних зразків РГЗ.

Отримані результати ми інтерпретували у гіпотетичний механізм, схематично зображений на рис. 8.6. Наявність патологічних біомінералів гідроксиапатитної природи стимулює експресію остеобластичних маркерів у пухлинній тканині РГЗ. Далі це призводить до виникнення і поширення метастазів з остеотропним фенотипом. Наявність серед метастатичної тканини РГЗ OPG-позитивних клітин може пояснити виникнення переважно остеолітичних метастазів при зазначеному варіанті злоякісних пухлин.

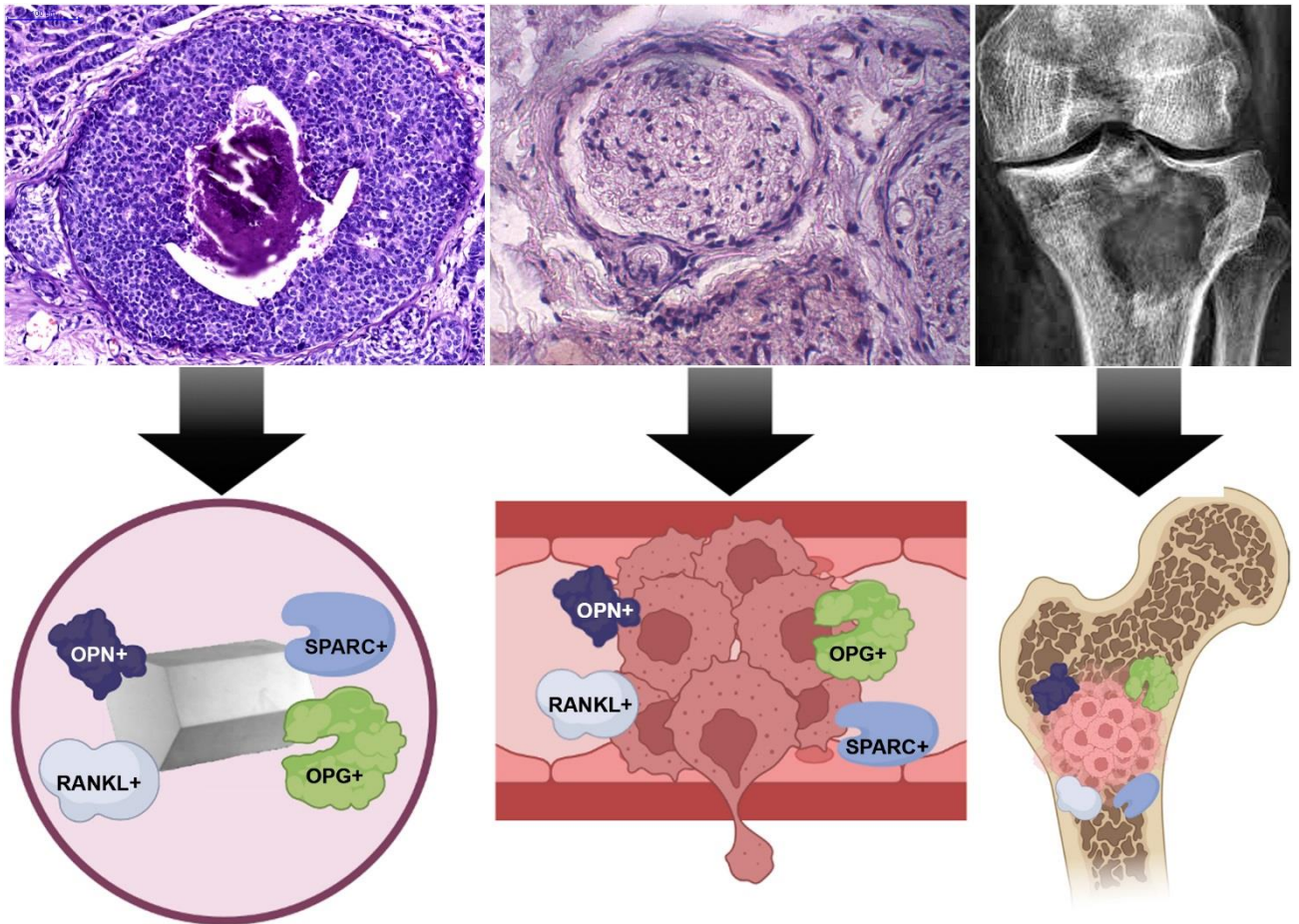


Рисунок 8.6 – Схема гіпотетичної взаємодії остеобластичних маркерів у клітинах РГЗ та кістковій тканині.

Пухлинне мікрооточення – важливий розділ досліджень в онкології, так як його роль у розвитку патологічного процесу, метастазуванні, гіршому прогнозі та рецидиву пухлин вже досліджується багато років та має актуальне значення серед умов сьогодення. Складається з стромальних та запальних клітин, таких як фібробласти, ендотеліальні клітини, перицити та імунні клітини [6, 7, 8]. Основну роль у розвитку проліферації неопластичних клітин, ангіогенезі та інвазії у навколишні тканини мають макрофаги, а саме макрофаги M1 та M2 [200]. Макрофаги типу M1 (CD68) має протизапальну і протипухлинну дію, а M2 (CD163) є імуносупресивним і виявляє про-пухлинну активність [9, 10, 11, 200].

Нами був проведений порівняльний аналіз клітинного складу запального інфільтрату у пухлинній тканині групи I та групи II, шляхом

підрахунку кількості позитивно забарвлених макрофагів CD68 та CD163. Експресія мала виражену цитоплазматичну локалізацію забарвлення. Макрофаги локалізувалися у стромі навколо пухлинної тканини, частина клітин проникала між солідними пластами пухлинного епітелію. Також позитивна реакція спостерігалася у частині ендотеліоцитів та фібробластів.

Імуногістохімічне дослідження зразків I групи та II групи зразків тканини РГЗ показало достовірну перевагу присутності макрофагів фенотипу M1 у тканині РГЗ з ознаками патологічної біомінералізації ($p < 0,05$) (рис 8.7).

Вивчення розподілу макрофагів фенотипу M2 між досліджуваними групами зразків РГЗ виявило велику кількість CD163-позитивних клітин у складі пухлинного мікрооточення. У позитивно забарвлених клітинах була інтенсивно забарвлена цитоплазма та частково мембрана. Переважна більшість клітин відповідала фенотипу макрофагів. Але, разом з тим, виявлялася помітна кількість веретиноподібних клітин, схожих на фібробласти, відмічалась позитивна цитоплазматична реакція у частин ендотелію.

У ході дослідження тканини РГЗ з біомінеральними включеннями було виявлено достовірно нижчий рівень експресії CD163-позитивних клітин, у порівнянні зі тканиною РГЗ II групи ($p < 0,05$) (рис 8.8).

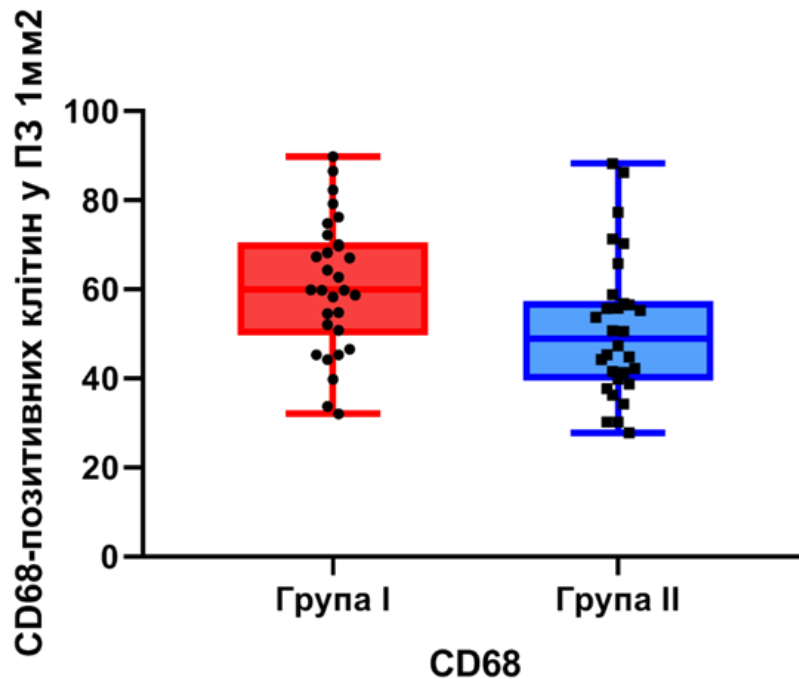


Рисунок 8.7 – ІГХ дослідження експресії маркера CD68 у тканині РГЗ досліджуваних груп. Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, $p < 0,05$

У дослідженнях Zhang та інших вказується, що пухлино асоційовані макрофаги мають велике значення у прогнозуванні пухлин. В їх дослідженні показано, що експресія CD68 була пов'язана з вищою експресією віментину та низькою експресією E-кадгерину, які є важливими маркерами переходу епітелію в мезенхіму, що може свідчить про те, що макрофаги мають вплив на індукування епітеліально-мезенхімального переходу та швидкому розповсюдженню пухлинного процесу та гіршому прогнозу [16]. У досліджах Gwak та інших було показано, що важливо оцінювати не тільки поляризацію макрофагів, але і зони пухлини, де вони розташовані. Згідно їх дослідженням у зразках РГЗ інфільтрація CD68 макрофагів у внутрішньопухлинному відділі або присутність CD163 макрофагів у стромі пухлини були пов'язані з поганим прогнозом. Також у цьому огляді показано, що висока експресія макрофагів CD68, CD163 в епітеліальній частині, або висока щільність макрофагів CD68 або CD163 у стромі пухлини були пов'язані також з гіршим прогнозом [17, 18].

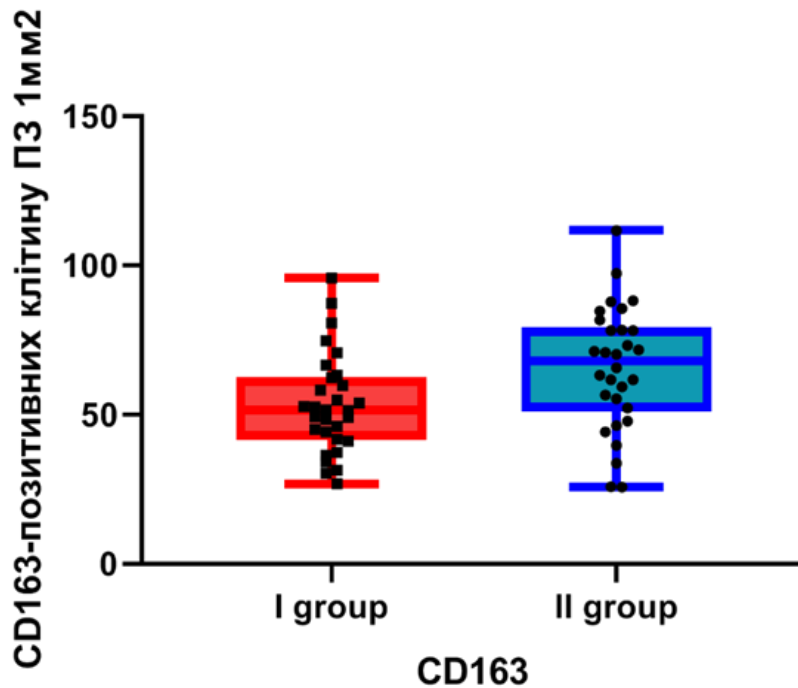


Рисунок 8.8 – ІГХ дослідження експресії маркера CD163 у тканині РГЗ досліджуваних груп. Столпчик позначає середнє значення, бар – 95 % інтервал достовірності, ($p < 0,05$).

За результатами дослідження Werhrhan було виявлено, що пригнічення кількості макрофагів M2 у тканині потрійно негативного РГЗ призводить до зменшення інфільтрації макрофагами у пухлині і зменшення метастазування [19]. Імуногістохімічне дослідження експресії CD163 виявило, що достовірно більша кількість макрофагів 2 типу знаходиться у тканинах зразків РГЗ без мікрокальцифікатів ($p < 0,05$). Локалізація більшості CD163-позитивних клітин відповідала стромі пухлини та деякі з них знаходилися між пухлинними клітинами.

Ґрунтуючись на отриманих нами результатах, можна зробити припущення про переважання макрофагів M1 у групі зразків РГЗ з мікрокальцифікатами. З іншого боку, тканина РГЗ без кальцифікатів має більше макрофагів типу M2. На нашу думку, це може вказувати на специфічний вплив присутності мікрокальцифікатів. Процеси патологічної біомінералізації перебігають за наявності запального процесу, який

підтримується, в тому числі, макрофагами M1. Отримані дані можна використати у перегляді оцінки ролі мікрокальцифікатів у перебігу РГЗ. Загалом, зазначені результати дещо суперечать частині досліджень, які показують негативну роль мікрокальцифікації у прогнозі РГЗ [3, 4, 19]. Іншими словами, мікрокальцифікати можуть непрямо зменшувати негативний вплив тумор-асоційованих макрофагів типу M2 через відносне зменшення їх кількості. При чому механізм цього феномену залишається неясний.

Імуногістохімічне дослідження експресії CD68- та CD163-позитивних клітин має деякі обмеження та застереження. Основна проблема полягає в позитивному забарвленні цими маркерами деяких популяцій клітин, таких як фібробласти, ендотеліоцити та перицити, що також є резидентами пухлинного мікрооточення. Для отримання більш однозначних висновків необхідні подальші дослідження.

За результатами імуногістохімічного дослідження було виявлено, що експресія CD68-позитивних макрофагів типу M1 достовірно вища у тканині зразків РГЗ з мікрокальцифікатами, у порівнянні зі зразками групи контролю ($p < 0,05$). З іншого боку, було встановлено, що кількість CD163-позитивних клітин достовірно вища у тканині РГЗ без кальцифікатів. Тим не менше, локалізація макрофагів типів M1 та M2 у пухлині мала спільні риси і фактично не відрізнялася.

Можливим механізмом впливу мікрокальцифікатів на поляризацію макрофагів є підтримка ними хронічного запалення у тканинах і сприяння розвитку таким чином у макрофагах прозапального M1 фенотипу.

Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:
[201-211]

ВИСНОВКИ

Мікрокальцифікати РГЗ відіграють важливе значення для діагностики, оцінки перебігу та розвитку ускладнень захворювання, зокрема метастазів до кісткової тканини. Дисертаційне дослідження присвячене вирішенню актуальної проблеми патоморфологічної діагностики, що стосується оптимізації діагностики і прогнозу перебігу РГЗ шляхом виявлення патоморфологічних особливостей інвазивної протокової карциноми ГЗ з наявністю мікрокальцифікатів, з'ясування патогенетичних особливостей розвитку пухлини за умов наявності біомінералізації у тканині пухлини.

1. За результатами дослідження поширеності РГЗ в Україні за областями (на 100 тис. жіночого населення) у період 2015-2020 років найбільша кількість випадків реєструється у м. Київ, Кіровоградській, Запорізькій, Сумській, Харківській та Херсонській областях, а найменші рівні показників захворюваності у Чернівецькій, Тернопільській, Рівненській, Івано-Франківській та Закарпатській областях, що пов'язано з рівнем діагностики та екологічною ситуацією середовища. Середній показник рівня захворюваності на РГЗ у Сумській області впродовж 2015-2020 рр. склав ($79,62 \pm 6,5 \%$), що перевищувало загальнодержаний рівень ($74,1 \pm 3,74 \%$). Найвища захворюваність на РГЗ у Сумській області в зазначений період спостерігалась у м. Суми ($81,62 \pm 10,71$), Путивльській ($79,35 \pm 16,76$) та Роменській ($78,52 \pm 11,46$). Найнижчий рівень захворюваності був у Липоводолинському ($50,4 \pm 4,3$), Серединобудському ($46,83 \pm 10,32$) та Білопільському ($41,93 \pm 11,31$) районах. Для Сумської області характерним є високий рівень захворюваності на РГЗ, проте у 2020 році простежується чітка тенденція до зниження цього показника внаслідок впливу пандемії вірусу SARS Cov-2 (Covid-19). На зростання кількості виявлених випадків РГЗ в Сумській області впливають комплекс чинників, зокрема покращання рівня якості клінічної та морфологічної діагностики в регіоні.

2. За результатами ретроспективного аналізу порівняння імуногістохімічної експресії рутинних маркерів РГЗ (рецептори естрогенів, прогестеронів та епідермального фактора росту Her2-neu) було встановлено відсутність достовірної різниці у групах зразків РГЗ з наявністю (група ІА) та відсутністю (група ІА) мікрокальцифікатів. Також не було відмічено прямого впливу близької локалізації мікрокальцифікатів у пухлинних тканинах на експресію рутинних діагностичних і прогностичних маркерів РГЗ.

3. Комплексне патогістологічне дослідження показало присутність сполук солей кальцію у всіх зразках групи І. З іншого боку, у 6 випадках було виявлено мікрокальцифікати відмінної природи поряд з типовими біомінеральними депозитами. Однак знову слід відмітити принципову різницю локалізації даних утворень. Поєднання різного типу мікрокальцифікатів у частині випадків інвазивного раку ГЗ на перший погляд знижує можливий діагностичний потенціал патологічної біомінералізації. Проте просторова локалізація мікрокальцифікатів у проведеному дослідженні має певну різницю. Мікрокальцифікати бурштинового кольору та з негативним забарвленням за методом фон Косса виявляються у просвітах і протоках розширених залоз, сполучна і жирова тканина грудної залози. Гістохімічне забарвлення з алізариновим червоним добре забарвлює обидва типи мікрокальцифікатів. OPN забарвлює як цитоплазму клітин, так і позаклітинних структур – поверхні кальцифікатів, волокон, місць формування біомінералів. На відміну від OPN, інші остеобластичні маркери не виявили прямої асоціації чи тропізму до поверхні патологічних біомінеральних утворень. При порівнянні імуногістохімічної експресії маркерів макрофагів CD68 та CD163 у зразках РГЗ з мікрокальцифікатами було виявлено переважання присутності прозапальних макрофагів типу M1.

4. Мікроскопічне дослідження за допомогою гістологічного, гістохімічного та імуногістохімічного методів II групи зразків РГЗ була верифікована відсутність ознак патологічної біомінералізації. Інтенсивність накопичення PAS-позитивних сполук у тканині РГЗ без мікрокальцифікатів

була невисокою. При імуногістохімічному оцінюванні зразків II групи щодо експресії остеобластичних маркерів OPN, SPARC, OPG, RANKL загалом було виявлено позитивну реакцію низької та помірної інтенсивності у більшості пухлинних клітин та частково у клітинах пухлинного мікрооточення. Імуногістохімічне дослідження експресії CD68- та CD163-позитивних клітин у тканині РГЗ II групи показало перевагу M2 макрофагів над M1 макрофагами. Отримані результати мають деякі обмеження та застереження. Основна проблема полягає в позитивному забарвленні CD68- та CD163 маркерами деяких популяцій клітин, таких як фібробласти, ендотеліоцити та перицити, що також є резидентами пухлинного мікрооточення.

5. За співвідношенням Ca/P (і наявності слідів органічної речовини за результатами елементного картування) мікрокальцифікати РГЗ відповідають зрілому гідроксиапатиту. Також у частині зразків РГЗ були виявлені біомінеральні утворення, які не мали у своєму складі фосфору і за рівнем вмісту кальцію відповідали оксалатам. Оскільки мікрокальцифікати РГЗ мали різну просторовою локалізацією у пухлинній тканині, то одночасна наявність оксалатів та гідроксиапатитів кальцію свідчить про те, що біомінеральні депозити мають різні умови для формування мікрокальцифікатів. Кристалічні наночастинки біомінеральних депозитів РГЗ були полідисперсними, з незначними коливаннями розмірів (3-20 нм), утворювали полікристалічні механічно стійкі агломерати розміром 100 – 300 нм.

6. Інвазивна протокова карцинома ГЗ з мікрокальцифікатами, порівняно з РГЗ без біомінералізації, демонструє більшу схильність до експресії остеобластичних маркерів OPN ($p < 0,001$), SPARC ($p < 0,05$), OPG ($p < 0,05$), що може пояснювати схильність РГЗ до метастазування до кісткової системи.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Розуміння впливу біомінералізації на біологічну поведінку РГЗ сприяє впровадженню мікрокальцифікатів як діагностичного та прогностичного чинника перебігу цієї хвороби, що може бути використане у менеджменті хворих з РГЗ.

2. Для ідентифікації мікрокальцифікатів у тканині РГЗ та експрес-визначення їх фазового складу рекомендоване додаткове використання гістохімічних методик забарвлення – забарвлення алізаріновим червоним у поєднанні з реакцією фон Косса.

3. Грунтуючись на проведених дослідженнях, був створений діагностичний алгоритм з урахуванням фазового складу мікрокальцифікатів, що у практичній діяльності лікарів дозволить оптимізувати діагностику РГЗ.

4. На підставі одержаних у дослідженні результатів був запропонований і запатентований спосіб ідентифікації і виділення мікрокальцифікатів з гістологічних блоків РГЗ, що використовується у наукових дослідженнях та може бути корисним у клінічній практиці.

ПРИМІТКИ

Основні результати дисертаційної роботи опубліковані у співавторстві з Москаленком Р. А., та Данильченком С. М.

Вважаю своїм приємним обов'язком висловити щире подяку науковому керівнику д.мед.н, професору Москаленку Роману Андрійовичу за вибір тематики, керівництво, мотивацію до роботи і постійну допомогу та підтримку. Окрема подяка завідувачу відділу радіаційної біофізики Інституту прикладної фізики Національної академії наук України, канд. фіз.-мат. наук Данильченку С.М. за можливість проведення та допомогу в проведенні фізико-хімічного та фазового аналізу біомінеральних депозитів раку грудної залози.

Москаленко Р. А.– запропонував пов'язати тематику дисертаційної роботи з комплексними дослідженнями процесів патологічної біомінералізаціїраку грудної залози, сформулював задачі досліджень, брав участь у спільних морфологічних дослідженнях, обговоренні результатів та підготовці статей.

Данильченко С. М. – брав участь у спільних фізико-хімічних дослідженнях, обговоренні результатів та підготовці наукових публікацій.

Виражаю щире подяку всьому колективу кафедри патологічної анатомії СумДУ за моральну підтримку, допомогу та активне обговорення результатів дисертаційної роботи на наукових семінарах.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Torre L, Siegel R, Ward E, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends—An Update. *American Association for Cancer Research*. 2016;25:16–27.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* . 2018;68:394–424. doi: 10.3322/caac.21492
3. Децик ОЗ. Аналіз захворюваності та смертності від злоякісних новоутворень губи і ротової порожнини в Україні та Івано-Франківській області за 2007–2016 рр. *Україна. Здоров'я нації*. 2017;3:95–100.
4. Tan P, Ellis I, Allison K. The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. *Histopathology*. 2020;77:181–185. doi: 10.1111/his.14091
5. Arnold M, Morgan E, Rumgay H. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast*. 2022;66:15–23. doi: 10.1016/j.breast.2022.08.010
6. Gosling S, Scott R, Greenwood C. Calcification Microstructure Reflects Breast Tissue Microenvironment. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2019;24:333–342. doi: 10.1007/s10911-019-09441-3
7. Hajibeigi A, Nasr K, Udayakumar D. Breast Tumor Microcalcification Induced by Bone Morphogenetic Protein-2: A New Murine Model for Human Breast Tumor Diagnosis. *Contrast Media Mol Imaging*. 2018;11:2082154. doi: 10.1155/2018/2082154
8. Clemenceau A, Michou L, Diorio C, Durocher F. Breast Cancer and Microcalcifications: An Osteoimmunological Disorder? *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8613. doi: 10.3390/ijms21228613

9. Goldberg J, Pastorello R, Vallius T. The Immunology of Hormone Receptor Positive Breast Cancer. *Front Immunol.* 2021;12:674192. doi: 10.3389/fimmu.2021.674192
10. Niwińska A, Olszewski W. The role of stromal immune microenvironment in the progression of ductal carcinoma in situ (DCIS) to invasive breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2021;23:118. doi: 10.1186/s13058-021-01494-9
11. Alves A, Diel L, Lamers M. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med.* 2018;47:460–467. doi: 10.1111/jop.12643
12. Manders K, Poll-Franse L, Creemers G. Clinical management of women with metastatic breast cancer: a descriptive study according to age group. *BMC Cancer.* 2006;6:179. doi: 10.1186/1471-2407-6-179
13. Cooperberg M, Broering J, Carroll P. Risk assessment for prostate cancer metastasis and mortality at the time of diagnosis. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:878–87. doi: 10.1093/jnci/djp122
14. Jatoi I, Miller A. Why is breast-cancer mortality declining?. *Lancet Oncol.* 2003;4:251–4. doi: 10.1016/s1470-2045(03)01037-4
15. DeSantis C, Ma J, Gaudet M. Breast cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* 2019;69:438–451. doi.org/10.3322/caac.21583
16. Marmot M, Altman D, Cameron D. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. *Lancet.* 2012;380:1778–86. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61611-0
17. Spak D, Plaxco J, Santiago L. BI-RADS® fifth edition: A summary of changes. *Diagn Interv Imaging.* 2017;98:179–190. doi: 10.1016/j.diii.2017.01.001
18. Romanjuk A, Lyndin M, Moskalenko R. The Role of Heavy Metal Salts in Pathological Biomineralization of Breast Cancer Tissue. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25:907–910. doi: 10.17219/acem/34472

19. Cox R, Hernandez-Santana A, Ramdass. Microcalcifications in breast cancer: novel insights into the molecular mechanism and functional consequence of mammary mineralisation. *Br J Cancer*. 2012;106:525–37
20. Baker R, Rogers K, Shepherd N. New relationships between breast microcalcifications and cancer. *Br J Cancer*. 2010;103:1034–139. doi: 10.1038/sj.bjc.6605873
21. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer*. 2019;11:151–164. doi: 10.2147/BCTT.S176070
22. Smolarz B, Nowak A, Romanowicz H. Breast Cancer-Epidemiology, Classification, Pathogenesis and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2022;14:2569. doi: 10.3390/cancers14102569
23. Escala-Garcia M. A network analysis to identify mediators of germlinedriven differences in breast cancer prognosis. *Nature Communications*. 2020;11:312-16. doi: 10.1038/s41467-019-14100-6
24. Ho W. European polygenic risk score for prediction of breast cancer shows similar performance in Asian women. *Nature Communications*. 2020;12:383-9. doi: 10.1038/s41467-020-17680-w
25. Ren W, Chen M, Qiao Y, Zhao F. Global guidelines for breast cancer screening: A systematic review. *Breast*. 2022;64:85–89. doi: 10.1016/j.breast.2022.04.003
26. Tamer F, Angelica G, James R. Inflammatory breast cancer: a proposed conceptual shift in the UICC–AJCC TNM staging system. *Lancet Oncol*. 2018;18:228–232.
27. Lacaze J, Aziza R, Chira C. Diagnosis, biology and epidemiology of oligometastatic breast cancer. *Breast*. 2021;59:144–156. doi: 10.1016/j.breast.2021.06.010
28. Evans D, Harkness E, Brentnall A. Breast cancer pathology and stage are better predicted by risk stratification models that include mammographic

density and common genetic variants. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2019;176:141–148. doi: 10.1007/s10549-019-05210-2

29. Louro J, Román M, Posso M. Differences in breast cancer risk after benign breast disease by type of screening diagnosis. *Breast*. 2020;54:343–348. doi: 10.1016/j.breast.2020.09.005

30. Torr B, Jones C, Choi S. A digital pathway for genetic testing in UK NHS patients with cancer: BRCA-DIRECT randomised study internal pilot. *Med Genet*. 2022;59:1179–1188. doi: 10.1136/jmg-2022-108655

31. Copson E, Maishman T, Tapper W. Germline BRCA mutation and outcome in young-onset breast cancer (POSH): a prospective cohort study. *Lancet Oncol*. 2018;19:169–180. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30891-4

32. Abubakar M, Chang-Claude J, Ali H. Etiology of hormone receptor positive breast cancer differs by levels of histologic grade and proliferation. *International Journal of Cancer*. 2018;143:746–757. doi: 10.1002/ijc.31352

33. Ooi B, Loh H, Ho P. The genetic interplay between body mass index, breast size and breast cancer risk: a Mendelian randomization analysis. *Int J Epidemiol*. 2019;48:781–794. doi: 10.1093/ije/dyz124

34. Jones M, Schoemaker M, Wright L. Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Research*. 2017;19:118. doi: 10.1186/s13058-017-0908-4

35. Barnes D, Silvestri V, Leslie G. Breast and Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variant Carriers Using Polygenic Risk Scores. *J Natl Cancer Inst*. 2022;114:109–122. doi: 10.1093/jnci/djab147

36. Łukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies-An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13:4287. doi: 10.3390/cancers13174287

37. Wakili M, Shehu H, Sharif M. Classification of Breast Cancer Histopathological Images Using DenseNet and Transfer Learning. *Comput Intell Neurosci*. 2022:8904768. doi: 10.1155/2022/8904768

38. Wu J, Hicks C. Breast Cancer Type Classification Using Machine Learning. *J Pers Med*. 2021;11:61. doi: 10.3390/jpm11020061
39. Pamilo M, Lönnqvist J, Halttunen A. Classification of findings in mammography screening--a method to minimise recall anxiety?. *1991;45:321–4*. doi: 10.1136/jech.45.4.321
40. Han Y, Wang J, Xu B. Clinicopathological characteristics and prognosis of breast cancer with special histological types: A surveillance, epidemiology, and end results database analysis. *Breast*. 2020;54:114–120. doi: 10.1016/j.breast.2020.09.006
41. Abubakar M, Figueroa J, Ali H. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and KI67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer. *Mod Pathol*. 2019;32:1244–1256. doi: 10.1038/s41379-019-0270-4
42. Zhang L, Huang Y, Feng Z. Comparison of breast cancer risk factors among molecular subtypes: A case-only study. *Cancer Med*. 2019;8:1882–1892. doi: 10.1002/cam4.2012
43. Fragomeni S, Sciallis A, Jeruss J. Molecular Subtypes and Local-Regional Control of Breast Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2018;27:95–120. doi:10.1016/j.soc.2017.08.005.
44. Mueller C, Haymond A, Davis J. Protein biomarkers for subtyping breast cancer and implications for future research. *Expert Rev Proteomics*. 2018;15:131–152. doi:10.1080/14789450.2018.1421071.
45. Asten K, Slembrouck L, Olbrecht S. Prognostic Value of the Progesterone Receptor by Subtype in Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER-2 Negative Breast Cancer. *Oncologist*. 2019;24:165–171. doi: 10.1634/theoncologist.2018-0176
46. Lacaze J, Aziza R, Chira C. Diagnosis, biology and epidemiology of oligometastatic breast cancer. *Breast*. 2021;59:144–156. doi: 10.1016/j.breast.2021.06.010

47. Atakpa E, Thorat M, Cuzick J, Brentnall A. Mammographic density, endocrine therapy and breast cancer risk: a prognostic and predictive biomarker review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;10:CD013091. doi: 10.1002/14651858.CD013091
48. Pettersson A, Graff R, Ursin G. Mammographic density phenotypes and risk of breast cancer: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106:dju078. doi:10.1093/jnci/dju078
49. Byrne C, Ursin G, Martin C. Mammographic Density Change with Estrogen and Progestin Therapy and Breast Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institute.* 2017;109:djx001. doi: 10.1093/jnci/djx001
50. Roberts KE, Adsett IT, Rickett K. Systemic therapies for preventing or treating aromatase inhibitor-induced musculoskeletal symptoms in early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2022;2022(1): CD013167. doi: 10.1002/14651858.CD013167.pub2
51. Walsh E, Smith K. Stearns Management of hormone receptor-positive, HER2-negative early breast cancer. *Semin Oncol.* 2020;47:187–200. doi: 10.1053/j.seminoncol.2020.05.010
52. Yu K, Cai Y, Wu S. Estrogen receptor-low breast cancer: Biology chaos and treatment paradox. *Cancer Commun (Lond).* 2021;41:968–980. doi: 10.1002/cac2.12191
53. Guo R, Lu G, Qin B, Fei B. Ultrasound Imaging Technologies for Breast Cancer Detection and Management: A Review. *Ultrasound Med Biol.* 2018;44:37–70. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio
54. Cazet A, Julien S, Bobowski M. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research volume.* 2010;12:204. doi: 10.1186/bcr2577
55. Li Z , Chunfang H, Yansheng W. Microcalcification and BMP-2 in breast cancer: correlation with clinicopathological features and outcomes. *OncoTargets and Therapy.* 2019;12:2023–2033. doi: 10.2147/OTT.S187835

56. Sarah G, Robert S, Charlene G. Calcification Microstructure Reflects Breast Tissue Microenvironment. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 2019;24:333–342. doi: 10.1007/s10911-019-09441-3
57. Choi S, Coonrod S, Estroff L, Fischbach C. Chemical and physical properties of carbonated HA affect breast cancer cell behavior. Published in final edited form as: *Acta Biomater*. 2015;15:333–342. doi: 10.1016/j.actbio.2015.06.001
58. Scimeca M, Bonfiglio R, Menichini E. Microcalcifications Drive Breast Cancer Occurrence and Development by Macrophage-Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition. *Int. J. Mol. Sci*. 2019;20:5633. doi: 10.3390/ijms20225633
59. Alsheh Ali M, Czene K, Hall P, Humphreys K. Association of Microcalcification Clusters with Short-term Invasive Breast Cancer Risk and Breast Cancer Risk Factors. *Scientific Reports*. 2019;9:14604. doi: 10.1038/s41598-019-51186-w
60. Hajibeigi A, Nasr K, Udayakumar D. Breast Tumor Microcalcification Induced by Bone Morphogenetic Protein-2: A New Murine Model for Human Breast Tumor Diagnosis. *Contrast Media & Molecular Imaging*. 2018;9. doi: 10.1155/2018/2082154
61. Logullo A, Prigenzi K, Nimir C. Breast microcalcifications: Past, present and future. *Mol Clin Oncol*. 2022;16:81. doi: 10.3892/mco.2022.2514
62. Rizwan A, Paidi S, Zheng C. Mapping the genetic basis of breast microcalcifications and their role in metastasis. *Scientific reports*. 2018;8:1067. doi: 10.1038/s41598-018-29330-9
63. Leong Y, Hasikin K, Lai K. Microcalcification Discrimination in Mammography Using Deep Convolutional Neural Network: Towards Rapid and Early Breast Cancer Diagnosi. *Frontiers in Public Health*. 2022;10:1–13. doi: 10.3389/fpubh.2022.875305

64. Wang S, Jiang H, Zheng C. Secretion of BMP-2 by tumor-associated macrophages (TAM) promotes microcalcifications in breast cancer. *BMC Cancer*. 2022;22:34. doi: 10.1186/s12885-021-09150-3
65. Baker R, Rogers K, Shepherd N, Stone N. Breast Cancer Calcifications: Identification Using a Novel Segmentation Approach. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. 2021:13. doi: 10.1155/2021/9905808
66. Wilkinson L, Thomas V, Sharma N. Microcalcification on mammography: approaches to interpretation and biopsy. *Br J Radiol*. 2017;90:9. doi: 10.1259/bjr.20160594
67. Nyante S, Lee S, Benefield T. The association between mammographic calcifications and breast cancer prognostic factors in a population-based registry cohort. *Cancer*. 2017;123:219–227. doi: 10.1002/cncr.30281
68. Michael E, He M, Li H. Breast Cancer Segmentation Methods: Current Status and Future Potentials. *BioMed Research International*. 2021:29. doi: 10.1155/2021/9962109
69. Bouzy P, O’Grady S, Madupalli H. A time-course Raman spectroscopic analysis of spontaneous in vitro microcalcifications in a breast cancer cell line. *Laboratory Investigation*. 2021;101:1267–1280. doi: 10.1038/s41374-021-00619-0
70. Ali M, Eriksson M, Czene K. Detection of potential microcalcification clusters using multivendor for-presentation digital mammograms for short-term breast cancer risk estimation. *Medical Physics*. 2019;46:9. doi: 10.1002/mp.13450
71. Kerlikowske K, Ma L, Scott G. Combining quantitative and qualitative breast density measures to assess breast cancer risk. *Breast Cancer Res*. 2017;19:97. doi: 10.1186/s13058-017-0887-5
72. Kim S, Tran T, Huiyeon S, Boyoung P. Microcalcifications, mammographic breast density, and risk of breast cancer: a cohort study. *Breast Cancer Research*. 2022;24:96. doi: 10.1186/s13058-022-01594-0

73. He F, Springer N, Whitman M. Hydroxyapatite mineral enhances malignant potential in a tissue-engineered model of ductal carcinoma in situ (DCIS). *Biomaterials*. 2019;224:119489. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119489
74. Mondal S, Manivasagan P, Bharathiraja S. Magnetic hydroxyapatite: a promising multifunctional platform for nanomedicine application. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:8389–8410. doi: 10.2147/IJN.S147355
75. Zhang K, Zhou Y, Xiao C. Application of hydroxyapatite nanoparticles in tumor-associated bone segmental defect. *Sci. Adv.* 2019;5:1–16. doi: 10.1126/sciadv.aax6946
76. Muttarak M, Kongmebhol P. Breast calcifications: which are malignant? *Singapore medical journal*/ 2009;1 50:907-913.
77. Liu J, Huang L. Image-guided vacuum-assisted breast biopsy in the diagnosis of breast microcalcifications. *J Int Med Res*. 2018 ;46(7):2743–2753. doi: 10.1177/0300060518770577
78. Metaxa L, Healy N, O’Keeffe S. Breast microcalcifications: the UK RCR 5-point breast imaging system or BI-RADS; which is the better predictor of malignancy? *Br J Radiol*. 2019;92:1–10. doi: 10.1259/bjr.20190177
79. Xue S, Zhao Q, Tai M. Correlation between Breast Ultrasound Microcalcification and the Prognosis of Breast Cancer. *Journal of Healthcare Engineering*. 2021:1–9. doi: 10.1155/2021/6835963
80. Li Y, Cao J, Zhou Y. Mammographic casting-type calcification is an independent prognostic factor in invasive breast cancer. *Scientific Reports*. 2019;9:10544. doi: 10.1038/s41598-019-47118-3
81. Scimeca M, Giannini E, Antonacci C, Pistolesse C. Microcalcifications in breast cancer: an active phenomenon mediated by epithelial cells with mesenchymal characteristics. *BMC Cancer*. 2014;14:284. doi: 10.1186/1471-2407-14-286

82. Scimeca M, Bonfiglio R, Menichini E. Microcalcifications Drive Breast Cancer Occurrence and Development by Macrophage-Mediated Epithelial to Mesenchymal Transition. *Int J Mol Sci.* 2019;20(22):5633. doi: 10.3390/ijms20225633
83. Allan A, George R, Vantyghem S. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer. *Am J Pathol.* 2006;169:233–46. doi: 10.2353/ajpath.2006.051152
84. Tsolaki E, Bertazzo S. Pathological Mineralization: The Potential of Mineralomic. *Materials.* 2019;12:3126. doi: 10.3390/ma12193126
85. Marro M, Rodríguez-Rivero A, Araujo-Andrade C. Unravelling the Encapsulation of DNA and Other Biomolecules in HAp Microcalcifications of Human Breast Cancer Tissues by Raman Imaging. *Cancers.* 2021;13:2658. doi: 10.3390/cancers13112658
86. Samadian H, Mobasheri H, Azami M, Faridi-Majidi R. Osteoconductive and electroactive carbon nanofibers/hydroxyapatite nanocomposite tailored for bone tissue engineering: in vitro and in vivo studies. *Scientific Reports.* 2020;10:14853. doi: 10.1038/s41598-020-71455-3
87. Lee K, Kim E, Yun J. Prognostic significance of expression of epithelial-mesenchymal transition driver brachyury in breast cancer and its association with subtype and characteristics. *Oncology letters.* 2018;15:1037–1045. doi: 10.3892/ol.2017.7402
88. Wang S, Jiang H, Zheng C. Secretion of BMP-2 by tumor-associated macrophages (TAM) promotes microcalcifications in breast cancer. *BMC Cancer.* 2022;22:34. . doi: 10.1186/s12885-021-09150-3
89. Lamort A, Giopanou I, Psallidas I, Stathopoulos G. Osteopontin as a Link between Inflammation and Cancer: The Thorax in the Spotlight. *Cells.* 2019;8:815. doi: 10.3390/cells8080815

90. Ziółkowski P, Woźniak M, Mansour A. Breast cancer risk in papilloma patients: Osteopontin splice variants indicate prognosis. *Breast Cancer Research*. 2022;24:64. doi: 10.1186/s13058-022-01561-9
91. Morgan MP, Cooke MM, Carthy GM. Microcalcifications associated with breast cancer: an epiphenomenon or biologically significant feature of selected tumors? *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 2005;10:181-187. doi: 10.1007/s10911-005-5400-6
92. Walaszek K, Lower E, Ziolkowski P, Weber G. Breast cancer risk in premalignant lesions: osteopontin splice variants indicate prognosis. *Molecular Diagnostics*. 2018:1259–1266. doi: 10.1038/s41416-018-0228-1
93. Xu K, Tian X, Oh S. The fibroblast Tiam1-osteopontin pathway modulates breast cancer invasion and metastasis. *Breast Cancer Research*. 2016;18:14. doi: 10.1186/s13058-016-0674-8
94. Raineri D, Dianzani C, Cappellano G. Osteopontin binds ICOSL promoting tumor metastasis. *Communications biology*. 2020;3:615. doi: 10.1038/s42003-020-01333-1
95. Kamalabadi-Farahani M, Atashi A, Jabbarpour Z, Aghayan S. Expression of osteopontin-5 splice variant in the mouse primary and metastatic breast cancer cells. *Research Notes*. 2022;15:286. doi: 10.1186/s13104-022-06179-w
96. Pio G, Xia Y, Piaseczny M. Soluble bone-derived osteopontin promotes migration and stem-like behavior of breast cancer cells. *Plos one*. 2017:1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0177640
97. Zhao H, Chen Q, Alam A. The role of osteopontin in the progression of solid organ tumour. *Cell Death & Disease*. 2018;9:356. doi: 10.1038/s41419-018-0391-6
98. Raineri D, Dianzani C, Cappellano G. Osteopontin binds ICOSL promoting tumor metastasis. *Communications biology*. 2020;3:615. doi: 10.1038/s42003-020-01333-1

99. Chengcheng H, Yuxin C, Sionen O. Human osteopontin: Potential clinical applications in cancer. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;39:1327–1337. doi: 10.3892/ijmm.2017.2964
100. Chae EY, Moon WK, Kim HH, Kim WH, Cha JH, Shin HJ. Association between ultrasound features and the 21-gene recurrence score assays in patients with estrogen receptor-positive, HER2-negative, invasive breast cancer. *Plos One*. 2016;11 (6):e0158461
101. Picon-Ruiz M, Morata-Tarifa C, Valle-Goffin JJ. Obesity and adverse breast cancer risk and outcome: Mechanistic insights and strategies for intervention. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(5):378-397. doi: 10.3322/caac.21405
102. Hellinger J, Schömel F, Buse J. Identification of drivers of breast cancer invasion by secretome analysis: insight into CTGF signaling. *Scientific Reports*. 2020;10:17889. doi: 10.1038/s41598-020-74838-8
103. Petri B, Klinge C. Regulation of breast cancer metastasis signaling by miRNAs / B. Petri. *Cancer Metastasis Rev*. 2020; 39:837–886. doi: 10.1007/s10555-020-09905-7
104. Shi S, Ma H, Xin-Ying H. Prognostic Significance of SPARC Expression in Breast Cancer: A Meta-Analysis and Bioinformatics Analysis. *BioMed Research International*. 2022;11. doi: 10.1155/2022/8600419
105. Sceneay J, Griessinger C, Hoffmann S. Tracking the fate of adoptively transferred myeloid-derived suppressor cells in the primary breast tumor microenvironment. *Plos one*. 2018:1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0196040
106. Gunawan I, Hatta M, Benyamin AF, Islam AA. The Hypoxic Response Expression as a Survival Biomarkers in Treatment-Naive Advanced Breast Cancer. 2020;21(3):629-637. doi: 10.31557/APJCP.2020.21.3.629
107. Araujo A, Abaurrea A, Azcoaga P. Stromal oncostatin M cytokine promotes breast cancer progression by reprogramming the tumor microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation*. 2022;132:1–17. doi: 10.1172/JCI148667

108. Lee S, Quiambao AL, Lee J, Ro J. Dietary Inflammatory Index and Risk of Breast Cancer Based on Hormone Receptor Status: A Case-Control Study in Korea. *Nutrients*. 2019;11(8):1949. doi: 10.3390/nu11081949
109. Dong H, Zhang L, Liu S. Targeting HMGB1: An available Therapeutic Strategy for Breast Cancer Therapy. *Int. J. Biol. Sci.* 2022;18:3421–3433. doi: 10.7150/ijbs.73504
110. Hillers-Ziemer L, Kuziel G, Williams A. Breast cancer microenvironment and obesity: challenges for therapy. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2022;41:627–647. doi: 10.1007/s10555-022-10031-9
111. Bahcecioglu G, Basara G, Ellis B. Breast cancer models: Engineering the tumor microenvironment. *Acta Biomater.* 2020;106:1–21. doi: 10.1016/j.actbio.2020.02.006
112. Zhang W, Shen Y, Huang H. A Rosetta Stone for Breast Cancer: Prognostic Value and Dynamic Regulation of Neutrophil in Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:1779. doi: 10.3389/fimmu.2020.01779
113. Morgan MP, Cooke MM, Christopherson, PA, Westfall PR. Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines. *Molecular carcinogenesis*. 2001; 32:111-117. doi: 10.1002/mc.1070
114. Xie H, Shao Z, Li D. Tumor microenvironment: driving forces and potential therapeutic targets for breast cancer metastasis. *Chinese Journal of Cancer*. 2017;36:1–10. doi: 10.1186/s40880-017-0202-y
115. Mehta A, Kadel S, Townsend M. Macrophage Biology and Mechanisms of Immune Suppression in Breast Cancer. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:1–17. doi: 10.3389/fimmu.2021.643771
116. Li J, Tsang J, Gary T. Tumor Microenvironment in Breast Cancer—Updates on Therapeutic Implications and Pathologic Assessment. *Cancers*. 2021;13:4233. doi: 10.3390/cancers13164233

117. Zarrilli G, Businello G, Dieci M. The Tumor Microenvironment of Primitive and Metastatic Breast Cancer: Implications for Novel Therapeutic Strategies. *Int. J. Mol.* 2020;21:8102. doi: 10.3390/ijms21218102
118. Araujo A, Abaurrea A, Azcoaga P. Stromal oncostatin M cytokine promotes breast cancer progression by reprogramming the tumor microenvironment. *J Clin Invest.* 2022;132:17. doi: 10.1172/JCI148667
119. Hong K, Zhang Y, Yao L. Tumor microenvironment-related multigene prognostic prediction model for breast cancer. *Aging.* 2022;14:845–868. doi: 10.18632/aging.203845
120. Zhou Y, Liang X, Guo L. Identification of senescence-related subtypes, establishment of a prognosis model, and characterization of a tumor microenvironment infiltration in breast cancer. *Frontiers in Immunology.* 2022;13:921182. doi: 10.3389/fimmu.2022.921182
121. Zhao J, Huang H. Breast cancer immunology and immunotherapy: targeting the programmed cell death protein-1/programmed cell death protein ligand-1. *Chinese Medical Journal.* 2020;133:853–862. doi: 10.1097/CM9.0000000000000710
122. Boieri M, Malishkevich A, Guennoun R. CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation. *J. Exp. Med.* 2022;7:1–23. doi: 10.1084/jem.20201963
123. Chu D, Phuong T, Tien N. The Effects of Adipocytes on the Regulation of Breast Cancer in the Tumor Microenvironment: An Update. *Cells.* 2019;8:857. doi: 10.3390/cells8080857
124. Jin J, Li Y, Zhao Q. Coordinated regulation of immune contexture: crosstalk between STAT3 and immune cells during breast cancer progression. *Cell Commun Signal.* 2021;19:50. doi: 10.1186/s12964-021-00705-2
125. Flister M, Bergom C. Genetic Modifiers of the Breast Tumor Microenvironment. *Trends Cancer.* 2018;4:429–444. doi: 10.1016/j.trecan.2018.04.003

126. Cha Y, Koo J. Role of Tumor-Associated Myeloid Cells in Breast Cancer. *Cells*. 2020;9:1785. doi: 10.3390/cells9081785
127. Munir M, Kay M, Kang M. Tumor-Associated Macrophages as Multifaceted Regulators of Breast Tumor Growth. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22:6526. doi: 10.3390/ijms22126526
128. Park M, Kim D, Kim A. Breast Cancer Metastasis: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:6806. doi: 10.3390/ijms23126806
129. Geng S, Fu Y, Fu S, Wu K. A tumor microenvironment-related risk model for predicting the prognosis and tumor immunity of breast cancer patients. *Frontiers in Immunology*. 2022;1–13. doi: 10.3389/fimmu.2022.927565
130. Hanna A, Balko J. Breast Cancer Resistance Mechanisms: Challenges to Immunotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2021;190:5–17. doi: 10.1007/s10549-021-06337-x
131. Scott E, Gocher, Workman C. Regulatory T Cells: Barriers of Immune Infiltration Into the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2021;12:10. doi: 10.3389/fimmu.2021.702726
132. Huang G, Zhou J, Chen J, Liu G. Identification of pyroptosis related subtypes and tumor microenvironment infiltration characteristics in breast cancer. *Scientific Reports*. 2022;12:10640. doi: 10.1038/s41598-022-14897-1
133. Kim S, Saeidi S, Zhong X. Breast cancer cell debris diminishes therapeutic efficacy through heme oxygenase-1-mediated inactivation of M1-like tumor-associated macrophages. *Breast cancer cell debris diminishes therapeutic efficacy*. 2020;11:606–616. doi: 10.1016/j.neo.2020.08.006
134. Qin H, Liu L, Sun S. The impact of PI3K inhibitors on breast cancer cell and its tumor microenvironment. *PeerJ*. 2018:1–27. doi: 10.7717/peerj.5092. eCollection 2018

135. Goff S, Danforth D. The Role of Immune Cells in Breast Tissue and Immunotherapy for the Treatment of Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2021;21:e63–e73. doi: 10.1016/j.clbc.2020.06.011
136. Segovia-Mendoza M, Morales-Montor J. Immune Tumor Microenvironment in Breast Cancer and the Participation of Estrogen and Its Receptors in Cancer Physiopathology. *Frontiers in Immunology*. 2019;10:348. doi: 10.3389/fimmu.2019.00348
137. Bates J, Derakhshandeh R, Jones L, Webb T. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *BMC Cancer*. 2018;18:556. doi: 10.1186/s12885-018-4441-3
138. Jesser E, Brady N, Danielle H. STAT5 is activated in macrophages by breast cancer cell-derived factors and regulates macrophage function in the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research*. 2021:104. doi: 10.1186/s13058-021-01481-0
139. Nelson M, Ngamcherdtrakul W, Luoh S, Yantasee W. Prognostic and therapeutic role of tumor-infiltrating lymphocyte subtypes in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2021;40:519–536. doi: 10.1007/s10555-021-09968-0
140. Boieri M, Malishkevich A, Guennoun R. CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation. *J Exp Med*. 2022;219(7):e20201963. doi: 10.1084/jem.20201963
141. Bai F, Jin Y, Zhang P. Bioinformatic profiling of prognosis-related genes in the breast cancer immune microenvironment. *Aging*. 2019;11:9328–9347. doi: 10.18632/aging.102373
142. Dantas D, Soares L, Novais S. Discrimination of Benign and Malignant Lesions in Canine Mammary Tissue Samples Using Raman Spectroscopy: A Pilot Study. *Animals (Basel)*. 2020;10:1652. doi: 10.3390/ani10091652
143. Fedorenko Z, Michailovich Y, Goulak L. Cancer in Ukraine 2015-2016. *Bulletin of national cancer registry of Ukraine*. 2017;18:1–88

144. Fedorenko Z, Michailovich Y, Goulak L. Cancer in Ukraine 2016-2017. Bulletin of national cancer registry of Ukraine. 2018;19:1–84
145. Fedorenko Z, Michailovich Y, Goulak L. Cancer in Ukraine 2017-2018.;Bulletin of national cancer registry of Ukraine. 2019;20:1–84
146. Fedorenko Z, Michailovich Y, Goulak L. Cancer in Ukraine 2018-2019. Bulletin of national cancer registry of Ukraine. 2020;21:1–84
147. Fedorenko Z, Michailovich Y, Goulak L. Cancer in Ukraine 2019-2020. Bulletin of national cancer registry of Ukraine. 2021;22:1–84
148. Fedorenko Z, Michailovich Y, Goulak L. Cancer in Ukraine 2020-2021. Bulletin of national cancer registry of Ukraine. 2022;23:1–89
149. Addanki S, Meas S, Sarli VN. Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Precision Oncology for Breast Cancers. Int J Mol Sci. 2022;23(14):7843. doi: 10.3390/ijms23147843
150. Матус СА, Левіна ГМ, Карпюк ТС, Денищик ОЮ. Аналітичний звіт «Базове дослідження стану та напрямів розвитку екологічної політики України та перспектив посилення участі організацій громадянського суспільства у розробці та впровадженні політик, дружніх до довкілля». На замовлення Міжнародного фонду «Відродження». 2019: 117
151. Ginsburg O, Yip C, Brooks A. Breast cancer early detection: a phased approach to implementation. Cancer. 2021; 126(Suppl 10):2379–2393. doi: 10.1002/cncr.32887

152. Madiha N, Joshua M, John H. Mammographic microcalcifications and breast cancer tumorigenesis: a radiologic-pathologic analysis. *BMC Cancer*. 2015;15:307. doi: 10.1186/s12885-015-1312-z
153. Leong Y, Hasikin K, Lai K. Microcalcification Discrimination in Mammography Using Deep Convolutional Neural Network: Towards Rapid and Early Breast Cancer Diagnosi. *Frontiers in Public Health*. 2022;10:1–13. doi: 10.3389/fpubh.2022.875305
154. Makena M, Rao R. Makena M. Subtype Specific Targeting of Calcium Signaling in Breast Cancer. *Cell Calcium*. 2020;85:20. doi: 10.1016/j.ceca.2019.102109
155. Sung S, Jeonghoon L, Ju K. Han Gene expression profiling of calcifications in breast cancer. *Scientific reports*. 2017;17:11427. doi: 10.1038/s41598-017-11331-9
156. Shadi A, Mikael E, Arvid S. Mammographic microcalcifications and risk of breast cancer. *British Journal of Cancer*. 2021;125:759–765. doi: 10.1038/s41416-021-01459-x
157. Masood S. Breast cancer subtypes: morphologic and biologic characterization. *Womens Health*. 2016;12:103–119. doi: 10.2217/whe.15.99
158. Sathyavathi R, Saha A, Soares J. Raman spectroscopic sensing of carbonate intercalation in breast microcalcifications at stereotactic biopsy. *Scientific Reports*. 2015:1–12. doi: 10.1038/srep09907

159. Ciecholewski M. Microcalcification Segmentation from Mammograms: A Morphological Approach. *Journal of Digital Imaging*. 2017;30:172–184. doi: 10.1007/s10278-016-9923-8
160. Kang D, Gweon H, Eun N. A convolutional deep learning model for improving mammographic breast-microcalcification diagnosis. *Scientific Reports*. 2021;11:23925. doi: 10.1038/s41598-021-03516-0
161. Ghamraoui B, Makeev A, Zidan A. Classification of breast microcalcifications using dual-energy mammography. *Journal of Medical Imaging*. 2019;6:1–9. doi: 10.1117/1.JMI.6.1.013502
162. Leborgne R. Diagnosis of tumors of the breast by simple radiography / Leborgne. *Nucl. Med*. 1951;65:1–11
163. Venkatesan A, Chu P, Kerlikowske K. Positive predictive value of specific mammographic findings according to reader and patient variables. *Radiology*. 2009;250:648–57. doi: 10.1148/radiol.2503080541
164. Kaltenbach B, Brandenbusch V, Möbus V. A matrix of morphology and distribution of calcifications in the breast: Analysis of 849 vacuum-assisted biopsies. *Eur J Radiol*. 2017;86:221–226. doi: 10.1016/j.ejrad.2016
165. Nabahati M, Ghaemian N, Moazezi Z, Mehraeen R. Different sonographic features of peripheral thyroid nodule calcification and risk of malignancy: a prospective observational study. *Pol J Radiol*. 2021.18;86:e366-e371. doi: 10.5114/pjr.2021.107450
166. Рєзнїк А, Гапченко А, Гапченко В. Ультразвукове ехо бїомїнералїзацїї щитоподїбної залози. *J. Clin. Exp. Med. Res*. 2015;3:188–198
167. Rominger M, Steinmetz C, Westerman R. Microcalcification-Associated Breast Cancer: Presentation, Successful First Excision, Long-Term Recurrence and Survival Rate. *Breast Care (Basel)*. 2015;10:380–5. doi: 10.1159/000440794

168. Katti K, Jasuja H, Kar S, Katti D. Nanostructured Biomaterials for In Vitro Models of Bone Metastasis Cancer. *Curr Opin Biomed Eng.* 2021;17:1–16. doi: 10.1016/j.cobme.2020.100254
169. Frappart L, Boudeulle M, Boumendil J. Structure and composition of microcalcifications in benign and malignant lesions of the breast: study by light microscopy, transmission and scanning electron microscopy, microprobe analysis, and X-ray diffraction. *Hum Pathol.* 1984;15:880–9. doi: 10.1016/s0046-8177(84)80150-1
170. Zhang Y, Wang C, Li Y. Carbonate and cation substitutions in hydroxylapatite in breast cancer micro-calcifications. *Mineral. Mag.* 2021;85:321–331
171. Castellaro AM, Tonda A, Cejas, HH, Ferreyra H. Oxalate Induces Breast Cancer. *BMC Cancer.* 2015;15 (1):1. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1747-2>
172. Wilkinson L, Thomas V, Sharma N. Microcalcification on Mammography: Approaches to Interpretation and Biopsy. *Br. J. Radiol.* 2017;90 (1069). <https://doi.org/10.1259/bjr.20160594>
173. Anders CK, Deal AM, Miller CR, Khorram C, Meng H. The prognostic contribution of clinical breast cancer subtype, age, and race among patients with breast cancer brain metastases. *Cancer.* 2011;117(8):1602-11. doi: 10.1002/cncr.25746

174. Wu K, Feng J, Lyu F. Exosomal miR-19a and IBSP cooperate to induce osteolytic bone metastasis of estrogen receptor-positive breast cancer. *Nat Commun.* 2021;12:5196. doi: 10.1038/s41467-021-25473-y
175. Chyzhma R, Piddubnyi A, Stepanenko A, Pylypenko O. The Study of the Nanocrystalline Structure of Psammoma Bodies of Serous Ovarian Carcinoma. 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2022:NRA03-1-NRA03-4, doi: 10.1109/NAP55339.2022.9934228
176. Holme TC, Reis MM, Thompson, A.; Robertson, A.; Parham, D.; Hickman, P.; Preece, P.E. Is Mammographic Microcalcification of Biological Significance? *Eur. J. Surg. Oncol.* 1993, 19, 250–253
177. Guerlain J, Perie S, Lefevre M, Perez J. Localization and characterization of thyroid microcalcifications: A histopathological study. *Plos One.* 2019;14(10):e0224138. doi: 10.1371/journal.pone.0224138. PMID: 31648281
178. Letavernier E, Bazin D, Daudon M. Description of Stone Morphology and Crystalluria Improve Diagnosis and Care of Kidney Stone Formers. *Healthcare (Basel).* 2022;11(1):2. doi: 10.3390/healthcare11010002
179. Ban J, Fock V, Aryee D, Kovar H. Mechanisms, Diagnosis and Treatment of Bone Metastases. *Cells.* 2021;10:2944
180. Tayubi I. Biomineralization associated alkaline phosphatase as a potential marker of bone metastasis in the patients with invasive breast cancer. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 2022;29:103340. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.103340
181. National Comprehensive Cancer Network. Доступно на: <https://www.nccn.org/Register>
182. Chae E, Moon W, Kim H. Association between Ultrasound Features and the 21-Gene Recurrence Score Assays in Patients with Oestrogen Receptor-Positive, HER2-Negative, Invasive Breast Cancer. *Plos One.* 2016;11:e0158461. doi: 10.1371/journal.pone.0158461

183. Patanaphan V, Salazar O, Slawson R, W Sewchand. A phase I/II trial of whole-abdominal plus pelvic irradiation for Astler-Coller stage beta 2, C colorectal cancer. *Am J Clin Oncol*. 1988;11:60–5. doi: 10.1097/00000421-198802000-00013
184. Kang Y. Dissecting tumor-stromal interactions in breast cancer bone metastasis. *Endocrinol. Metab*. 2016;31:206–212
185. Manders K. Clinical management of women with metastatic breast cancer: a descriptive study according to age group. *BMC Cancer*. 2006;6:179
186. Coleman RE. Clinical features of metastatic bone disease and risk of skeletal morbidity. *Clin. Cancer Res*. 2006;12:6243s–6249s
187. Tevaarwerk A, Gray R, Schneider B. Survival in patients with metastatic recurrent breast cancer after adjuvant chemotherapy: little evidence of improvement over the past 30 years. *Cancer*. 2013;119:1140–8. doi: 10.1002/cncr.27819
188. Guise, T. A. The vicious cycle of bone metastases. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact*. 2002:570–572
189. Piddubnyi AM, Danylchenko SM, Romaniuk AM, Moskalenko R A. Prostatic calculi cause osteoblastic immunophenotype of prostate cancer. *Патология*. 2019;2(46):170–176
190. Allan A, George R, Vantyghem S. Role of the integrin-binding protein osteopontin in lymphatic metastasis of breast cancer. *Am J Pathol*. 2006;169:233–46. doi: 10.2353/ajpath.2006.051152
191. Feng M, Grice DM, Faddy HM, Nguyen N. Store-Independent Activation of Orai1 by SPCA2 in Mammary Tumors. *Cell*. 2010;143 (1):84–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.040>
192. Reid PE, Brown NJ, Holen I. Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell. *Molecular Cancer*. 2009;8(1):49. doi:10.1186/1476-4598-8-49
193. Ottewell P, Wilson C. Bone-targeted agents in breast cancer: do we now have all the answers? *Breast Cancer*. 2019;13:117822341984350

194. Ozaki Y, Koide M, Furuya Y, Ninomiya T. Treatment of OPG-deficient mice with WP9QY, a RANKL-binding peptide, recovers alveolar bone loss by suppressing osteoclastogenesis and enhancing osteoblastogenesis. *Plos One*. 2017;12(9):e0184904. doi: 10.1371/journal.pone.0184904
195. Kenkre JS, Bassett HD. The bone remodelling cycle. *Ann. Clin. Biochem*. 2018;55:308–327. doi: 10.1177/0004563218759371
196. AlQranei MS, Senbanjo LT, Aljohani H, Hamza T, Chellaiah MA. Lipopolysaccharide- TLR-4 Axis regulates Osteoclastogenesis independent of RANKL/RANK signaling. *BMC Immunol*. 2022;22(1):23. doi: 10.1186/s12865-021-00409-9
197. Tulotta C, Groenewoud A, Snaar-Jagalska B, Ottewell P. Animal Models of Breast Cancer Bone Metastasis. *Methods Mol Biol*. 2019;1914:309–330. doi: 10.1007/978-1-4939-8997-3_17
198. Guweidhi A, Kleeff J, Adwan H. Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann Surg*. 2005;242:224–34. doi: 10.1097/01.sla.0000171866.45848.68
199. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 2005;436(7050):518–524. doi: 10.1038/nature03799
200. Qian B, Pollard J. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010;141:39–51. doi: 10.1016/j.cell.2010.03.014
201. Piddubnyi A, Kolomiets O, Danilchenko S. The Prospects of Using Structural Phase Analysis of Microcalcifications in Breast Cancer Diagnostics. *Diagnostics*. 2023;13:737. doi: 10.3390/diagnostics13040737
202. Kovalev V, Diachenko Y, Malyshev V. Comparative features of open source software products for the development of an automated breast cancer diagnostic program. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2019;7:377–385

203. Kolomiets O, Yazykov O, Lukavenko I. The existence of calcifications in breast cancer tissue doesn't affect expression of HER2-neu protein. *European Journal of Pathology*. 2020: S 226
204. Kolomiets O, Yazykov O, Moskalenko R. Osteopontin overexpression in invasive ductal breast carcinoma with mineralization. *Biomedical perspectives*. 2021:97
205. Kolomiets O, Piddubnyi A, Danilchenko S. et al. Morphological and crystal-chemical features of breast cancer microcalcificates. *European Journal of Pathology*. 2022;481 (Suppl 1): S 66
206. Kolomiets O, Piddubnyi A, Danilchenko S. The role of oxalate nanocrystalline for differential diagnostics of the breast pathology. Twenty third annual conference – YUCOMAT. 2022:94
207. Kolomiets O, Piddubnyi A, Moskalenko R. The Structure of Nanocrystalline Apatite From the Breast Cancer. 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2022:NRA04-1-NRA04-4. doi: 10.1109/NAP55339.2022.9934287
208. Kolomiets O, Moskalenko R. Breast cancer with microcalcificates: a bibliometric analysis. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2022;10:300-308
209. Коломієць ОО, Москаленко РА. Статистичний аналіз раку грудної залози в Україні та Сумській області за 2015-2020 роки. *Науковий вісник Ужгородського університету*. 2023;1:75–79
210. Спосіб дослідження мікрокальцифікатів грудної залози з парафінових гістологічних блоків: пат. 144394 Україна, МПК (2020.01),

G01N 1/28, № u 2020 02521; заявл. 22.04.2020; опубл. 25.09.2020, Бюл. №18. 4 с.

211. Kolomiets O, Moskalenko R. Immunohistochemical study of M1 and M2 macrophages in breast cancer with microcalcifications. Eastern Ukrainian Medical Journal . 2023;11:155–163

ДОДАТКИ

Додаток А1

Шаблон за версією 02
Затверджено наказом ректора СумДУ
№ 0817-І від 05.12.2022 р.



ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор

Сергій ЛЕОНОВ

04 2023 р.

АКТ

впровадження (використання) результатів

науково-дослідної роботи (етапу НДР) / дисертаційної роботи у навчальний процес

«Патоморфологічна характеристика та оптимізація діагностики та прогнозу інвазивного протокового раку грудної залози з біомінералізацією», яка виконана в період з 01.10.2019 р. по 31.03.2023 р.

У ході виконання дисертаційного дослідження було встановлено відсутність впливу мікрокальцифікатів на рівень експресії рецепторів естрогену, рецепторів прогестерону та епідермального фактора росту 2 у тканині інвазивного протокового раку грудної залози. У тканині раку грудної залози з біомінералізацією були виявлені вищі рівні імуногістохімічної експресії остеопонтину. Завдяки своєму відомому протуморогенному ефекту він має потенційне негативне прогностичне значення щодо прогресування раку молочної залози. Проте участь остеопонтину в канцерогенезі раку грудної залози, очевидно, впливає на високий рівень його імуногістохімічної експресії в тканині без ознак біомінералізації. За співвідношенням Са/Р (і наявністю слідів органічної речовини) мікрокальцифікати пухлинної тканини відповідають зрілому гідроксиапатиту та оксалату кальцію. Одночасна присутність оксалату кальцію та гідроксиапатиту у раковій тканині грудної залози супроводжувалася різною просторовою локалізацією мікрокальцифікатів. Це може бути пов'язано з різними умовами їх формування, що дозволяє розглядати цей феномен у якості потенційної діагностичної ознаки для ранньої діагностики раку грудної залози.

Здобувач наукового ступеня доктора філософії:  Олена КОЛОМІЄЦЬ

Комісія в складі:

Голова комісії: голова ради з якості ННМІ  Вікторія ПЕТРАШЕНКО

Члени комісії:

- гарант освітньої програми ОНП 222. Медицина (доктор філософії) Юрій АТАМАН
- завідувач кафедри онкології та радіології СумДУ Ігор ВИННИЧЕНКО
- начальник ЦККНО «Біомедичний дослідницький центр» Максим ПОГОРЕЛОВ

Встановила, впровадження в навчальний процес результатів досліджень та місце їх використання: при викладанні дисциплін «Онкологія», «Патоморфологія», «Методологія та методи наукових досліджень», «Біохімічні та імунологічні методи діагностики в терапії та хірургії за міжнародними стандартами» та «Застосування європейської освіти для медичної галузі України: Біоматеріали» у практичні заняття для здобувачів вищої освіти ОНП 222 «Медицина» (доктор філософії).

« 03 » 04 2023 р.

Голова комісії:  Вікторія ПЕТРАШЕНКО

Члени комісії:  Юрій АТАМАН
 Ігор ВИННИЧЕНКО
 Максим ПОГОРЕЛОВ

Додаток А2

ЗАТВЕРДЖУЮ



Проректор з наукової роботи
Харківського національного
медичного університету
проф. Валерій М'ЯСОЄДОВ
« 01 » _____ 06 _____ 20 23 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): Спосіб ранньої діагностики раку грудної залози на основі структурно-фазового аналізу мікрокальцинатів.
2. **Ким і коли запропонований**: Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Коломієць О.О., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), 2022 р.
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Piddubnyi A, *Kolomiets O*, Danilchenko S, Stepanenko A, Moskalenko Y, Moskalenko R. The Prospects of Using Structural Phase Analysis of Microcalcifications in Breast Cancer Diagnostics. *Diagnostics*. 2023; 13(4):737. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040737>
4. **Де і коли впроваджено**: кафедра патологічної анатомії Харківського національного медичного університету, 2023 р.
5. **Результати застосування методу за період з лютого 2023 р. по травень 2023 р.:** Впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії Харківського національного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, клінічними ординаторами та аспірантами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3):** Використання результатів роботи в навчальному процесі та науково-дослідній роботі дозволяє поглибити знання студентів, лікарів-інтернів, клінічних ординаторів і аспірантів з питань патоморфологічних характеристик раку грудної залози з біомінералізацією.
7. **Зауваження, пропозиції**: не має.

Відповідальний(і) за впровадження

В.о. завідувача кафедри
патологічної анатомії ХНМУ,
доктор медичних наук, професор

31.05.2023р.
(дата)

Ірина СОРОКІНА


(підпис)

Додаток АЗ

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор

науково-педагогічної роботи

Полтавського державного

медичного університету

проф. Дзариня В.М.



_____ 2023р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиція** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): бібліометричний аналіз та дослідження даних щодо патоморфологічних характеристик раку грудної залози з біомінералізацією
2. **Ким і коли запропонований:** Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, проф. Москаленко Р.А., асп. Коломієць О.О. (40022, м. Суми, вул. Привокзальна,31), впродовж вересня-грудня 2022 року
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Kolomiets O, Moskalenko R. Breast cancer with microcalcificates: a bibliometric analysis. EUMJ. 2022;10(4):300-308. DOI: [https://doi.org/10.21272/eumj.2022;10\(4\):300-308](https://doi.org/10.21272/eumj.2022;10(4):300-308) «Eastern Ukrainian Medical Journal» №4 (10), 2022 year, 300-308 pages, index UDK 618.19-006-003.84:001.891
4. **Де і коли впроваджено:** кафедра патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету.
5. **Результати застосування методу за період з вересня 2022 року по грудень 2022 року:** Впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії та судової медицини Полтавського державного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі здобувачами вищої освіти другого (магістерського) рівня (ОШМ Медицина, ОШМ Педіатрія), лікарями-інтернами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3):** Поглиблення знань здобувачів вищої освіти, лікарів-інтернів з питань патоморфологічних особливостей раку грудної залози з біомінералізацією.
7. **Зауваження, пропозиції:** не має.

Пропозиція обговорена та затверджена на кафедральному засіданні (протокол № 9 від 05 січня 2023 року).

Відповідальний(і) за впровадження
завідувач патологічної анатомії та
судової медицини ПДМУ

проф. І.І. Старченко

Додаток А4



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): У ході виконання дисертаційного дослідження встановлено відсутність впливу мікрокальцифікатів на рівень експресії рецепторів естрогену, рецепторів прогестерону та епідермального фактора росту 2 у тканині інвазивного протокового раку грудної залози. У тканині раку грудної залози з біомінералізацією були виявлені вищі рівні імуногістохімічної експресії остеопонтину. За співвідношенням Са/P (і наявністю слідів органічної речовини) мікрокальцифікати пухлинної тканини відповідають зрілому гідроксипатиту та оксалату кальцію. Одночасна присутність оксалату кальцію та гідроксипатиту в тканині карциноми грудної залози супроводжувалася різною просторовою локалізацією мікрокальцифікатів. Це може бути пов'язано з різними умовами їх формування, що дозволяє розглядати цей феномен у якості потенційної діагностичної ознаки для ранньої діагностики раку грудної залози.
2. **Ким і коли запропонованої:** Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Коломієць О.О., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж лютого-травня 2023 року
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Piddubnyi A, Kolomiets O, Danilchenko S, Stepanenko A, Moskalenko Y, Moskalenko R. The Prospects of Using Structural Phase Analysis of Microcalcifications in Breast Cancer Diagnostics. *Diagnostics*. 2023; 13(4):737. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040737>
4. **Де і коли впроваджено:** кафедра патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету.
5. **Результати застосування методу за період з лютого 2023 року по травень 2023 року:** Впровадження у навчальний процес на кафедрі патологічної анатомії Буковинського державного медичного університету в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, вилученими в джерелі інформації (п.3):** Поглиблення знань студентів, лікарів-інтернів, клінічних ординаторів та аспірантів з питань патоморфологічних характеристик раку грудної залози з біомінералізацією.
7. **Зауваження, пропозиції:** немає.

Відповідальний за впровадження
завідувач кафедри патологічної
анатомії БДМУ

 проф. І.С. Давиденко

Додаток А5

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор

з науково-педагогічної роботи

Харківського національного

університету імені В. Н. Каразіна

Антон ПАНТЕЛЕЙМОНОВ

« 09 » 2023 р.



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: У ході виконання дисертаційного дослідження було встановлено, що за співвідношенням Са/P (і наявністю слідів органічної речовини) мікрокальцифікати пухлинної тканини грудної залози відповідають зрілому гідроксипатиту та оксалату кальцію, що дозволяє розглядати цей феномен у якості потенційної діагностичної ознаки для ранньої діагностики раку грудної залози.

2. Ким і коли запропонований: Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Коломієць О.О., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж лютого-травня 2023 року.

3. Джерела інформації (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Pidubnyi A, *Kolomiets O*, Danilchenko S, Stepanenko A, Moskalenko Y, Moskalenko R. The Prospects of Using Structural Phase Analysis of Microcalcifications in Breast Cancer Diagnostics. *Diagnostics*. 2023; 13(4):737. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040737>

4. Де і коли впроваджено: кафедра загальної та клінічної патології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

5. Результати застосування методу за період з лютого 2023 року по травень 2023 року: Впровадження у навчальний процес на кафедрі загальної та клінічної патології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна в лекційному курсі, при проведенні практичних занять зі студентами, лікарями-інтернами, клінічними ординаторами та аспірантами, а також у науково-дослідну роботу кафедри.

6. Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п. 3): Поглиблення знань студентів, лікарів-інтернів, клінічних ординаторів та аспірантів з питань патоморфологічних характеристик раку грудної залози з біомінералізацією.

7. Зауваження, пропозиції: немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри

загальної та клінічної патології

Харківського національного

університету імені В. Н. Каразіна

доктор медичних наук, професор



Олена ПРОЦЕНКО

Додаток А8

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор багатопрофільного

Медичного лікувально-

діагностичного центру "МЕДЕЯ"

Клиш Д.О.



6 2023р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження** (метод профілактики, діагностики, лікування, пристрій, форма організаційної роботи та ін.): дані про мікрокальцифікати пухлинної тканини грудної залози, а саме гідроксиапатиту та оксалату кальцію та їх роль у ранній діагностиці раку грудної залози.
2. **Ким і коли запропонований:** Сумський державний університет, кафедра патологічної анатомії, асп. Коломієць О.О., проф. Москаленко Р.А. (40007, м. Суми, вул. Марко Вовчок, 2), впродовж лютого-травня 2023 року
3. **Джерела інформації** (методичні рекомендації, інформаційний лист, звіт про НДР, дисертація, монографія, з'їзди, конференції, семінари та ін.): Pidubnyi A, Kolomiets O, Danilchenko S, Stepanenko A, Moskalenko Y, Moskalenko R. The Prospects of Using Structural Phase Analysis of Microcalcifications in Breast Cancer Diagnostics. Diagnostics. 2023; 13(4):737. <https://doi.org/10.3390/diagnostics13040737>
4. **Впроваджено:** у діагностичну та клінічну роботу відділення хірургії багатопрофільного медичного лікувально-діагностичного центру "МЕДЕЯ"
5. **Включено:** у практичну роботу відділення хірургії багатопрофільного медичного лікувально-діагностичного центру "МЕДЕЯ"
6. **Результати впровадження:** введено у роботу відділення хірургії багатопрофільного медичного лікувально-діагностичного центру "МЕДЕЯ"
7. **Термін впровадження:** лютий-травень 2023
8. **Базова установа, яка проводить впровадження:** відділення хірургії багатопрофільного медичного лікувально-діагностичного центру "МЕДЕЯ"
9. **Зауважень, пропозицій:** не має

Відповідальний за впровадження
завідувач відділення хірургії
багатопрофільного медичного
лікувально-діагностичного центру "МЕДЕЯ"

В.А. Бабіч

Додаток Б



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **144394** (13) **U**

(51) МПК (2020.01)

G01N 1/28 (2006.01)**G01N 21/00**

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2020 02521	(72) Винахідник(и): Москаленко Роман Андрійович (UA), Коломієць Олена Олегівна (UA), Кузенко Євген Вікторович (UA), Романюк Анатолій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.04.2020	(73) Володілець (володільці): СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Римського-Корсакова, 2. м. Суми, 40007 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 26.09.2020	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 25.09.2020, Бюл. № 18	

(54) СПОСІБ ДОСЛІДЖЕННЯ МІКРОКАЛЬЦИФІКАТІВ ГРУДНОЇ ЗАЛОЗИ З ПАРАФІНОВИХ ГІСТОЛОГІЧНИХ БЛОКІВ**(57) Реферат:**

Спосіб дослідження мікрокальцифікатів грудної залози з парафінових гістологічних блоків включає відбір біологічного матеріалу шляхом одержання з парафінових блоків гістологічних зрізів, розміщення їх на предметному столику та проведення дослідження за допомогою скануючого мікроскопа з енергодисперсивним рентгенівським спектроскопом. Як біологічний матеріал використовують гістологічний матеріал з підтвердженим вмістом мікрокальцифікатів. Гістологічні зрізи готують товщиною 5-7 мкм, після чого їх розміщують на предметний столик, виготовлений з спектрально чистого вуглецю. Перед проведенням досліджень на скануючому мікроскопі з енергодисперсивним рентгенівським спектроскопом, зрізи витримують 30 хвилин у термостаті при температурі 60 °С та проводять депарафінізацію шляхом двократного покриття зрізів спочатку ксилолом по 5 хв., потім 96 % етиловим спиртом по 5 хв., і 70 % етиловим спиртом по 2 хв. Після цього промивають дистильованою водою впродовж 2 хв.

UA 144394 U

UA 144394 U

Корисна модель належить до галузі медицини та біології, а саме до патологічної анатомії, молекулярної біології, хірургії, патологічної фізіології, гістології, та може бути використана для аналізу мінеральних сполук за допомогою скануючої електронної та атомної силової мікроскопії.

Відомий спосіб дослідження зразків мікрокальцифікатів грудної залози з парафінових гістологічних блоків для проведення експериментальних та клінічних досліджень, що включає відбір парафінових блоків для дослідження, який відбувається шляхом їх сканування в перпендикулярній та паралельній площинах за допомогою комп'ютерного томографа Nikon Metrology XT H225 CT при напрузі 20 кВ. На основі об'ємної реконструкції комп'ютерних томограм та їх скринінгу відбиралися парафінові блоки з ідентифікованими мікрокальцифікатами пухлин грудної залози біля краю поверхні блока. Наступний етап це підготовка гістологічних зрізів товщиною 5 мкм, які розміщуються на полірованому столику для скануючої електронної мікроскопії з алюмінієвого сплаву діаметром 25 мм для подальшого рентген-дифракційного дослідження, [див. статтю Scott R et al. Relationships between pathology and crystal structure in breast calcifications: an in situ X-ray diffraction study in histological sections. Breast Cancer (2016) 2, 16029; doi:10.1038/npjbcancer.2016.29; published online 14 September 2016].

Даний спосіб є найближчим аналогом по суті та результатам, які досягаються.

Недоліком найближчого аналога є те, що він потребує дорогого обладнання та спеціального програмного забезпечення, а також використання обладнання з матеріалів, які при проведенні досліджень погіршують якість отриманих зображень і точність хімічного аналізу зразків.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалення способу дослідження мікрокальцифікатів грудної залози з парафінових гістологічних блоків, що дозволить проводити дослідження без залучення дорогого складного обладнання і покращити якість отриманих зображень і точність хімічного аналізу зразків.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі дослідження мікрокальцифікатів грудної залози з парафінових гістологічних блоків, який включає відбір біологічного матеріалу шляхом одержання з парафінових блоків гістологічних зрізів, розміщення їх на предметному столику та проведення дослідження за допомогою скануючого мікроскопа з енергодисперсивним рентгенівським спектроскопом, згідно з корисною моделлю, як біологічний матеріал використовують гістологічний матеріал з підтвердженням вмістом мікрокальцифікатів, а гістологічні зрізи готують товщиною 5-7 мкм, після чого їх розміщують на предметний столик, виготовлений з спектрально чистого вуглецю, і, перед проведенням досліджень на скануючому мікроскопі з енергодисперсивним рентгенівським спектроскопом, зрізи витримують 30 хвилин у термостаті при температурі 60 °С та проводять депарафінізацію шляхом двократного покриття зрізів спочатку ксилолом по 5 хв., потім 96 % етиловим спиртом по 5 хв., і 70 % етиловим спиртом по 2 хв., після чого промивають дистильованою водою впродовж 2 хв.

Використання - заявленого способу з усіма суттєвими ознаками, включаючи відмінні, дозволяє отримати зразки тканини грудної залози з мікрокальцифікатами з низьким відсотком втрат та механічного ушкодження, досліджувати мікрокальцифікати грудної залози впродовж всього часу зберігання парафінового блока тканини.

Спосіб здійснюється таким чином.

Мікрокальцифікати у тканини раку грудної залози виявляють при проведенні гістологічного дослідження. З кожного парафінового блока на мікротомі отримують 3-4 зрізи товщиною 5-7 мкм, які переносять на графітові предметні столики. Гістологічні зрізи витримували у термостаті при температурі 60 °С впродовж 30 хв. Потім проводить депарафінізацію підготовлених гістологічних зрізів при кімнатній температурі шляхом поетапної відмивки зрізів тканин від парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту. Гістологічний зріз тканини грудної залози на графітовому предметному столику покривають 1-2 мл ксилолу протягом 5 хвилин два рази. Далі проводять двократну промивку зрізів 1-2 мл 96 % етилового спирту впродовж 5 хвилин для кожної промивки, потім промивають 1-2 мл 70 % етилового спирту впродовж 2 хвилин 2 рази. Після цього одноразово промивають 1-2 мл дистильованої води впродовж 2 хвилин. Отримані зразки проаналізують на скануючому електронному мікроскопі і проводять рентген-дифракційний мікроаналіз.

Приклад. Відбір біологічного матеріалу проводили з вибраних парафінових гістологічних блоків тканин пухлин грудної залози людини, в яких після гістологічного дослідження виявлені мікрокальцифікати. Для дослідження відібрали 30 парафінових блоків, які зберігалися в архіві Сумського обласного онкологічного диспансеру впродовж 1-2 років. З кожного парафінового блока на мікротомі підготували 3-4 зрізи товщиною 5-7 мкм, які перенесли на графітові предметні столики. Гістологічні зрізи витримали 30 хв., у термостаті при температурі 60 °С. Потім провели депарафінізацію підготовлених гістологічних зрізів при кімнатній температурі

UA 144394 U

- 5 шляхом поетапної відмивки зрізів тканин від парафіну із використанням ксилолу та етилового спирту. Гістологічний зріз тканини грудної залози на графітовому предметному столику покрили ксилолом (1-2 мл) протягом 5 хвилин два рази. Потім провели двократну промивку зрізів 96 % етиловим спиртом (1-2 мл) впродовж 5 хвилин для кожної промивки, далі 70 % етиловим спиртом (1-2 мл) впродовж 2 хвилин 2 рази, потім покривають порцією дистильованої води (1-2 мл) впродовж 2 хвилин одноразово. Отримані зразки проаналізували на скануючому електронному мікроскопі і провели рентген-дифракційний мікроаналіз.

- 10 Запропонований спосіб є детальним та точним, дає можливість проаналізувати банк зразків парафінових блоків тканин з архівів патологоанатомічних відділень і бюро та вибірково досліджувати мікрокальцифікати грудної залози впродовж тривалого часу спостереження, особливо у випадку злоякісних пухлин, парафінові блоки яких зберігаються 25 років.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 15 Спосіб дослідження мікрокальцифікатів грудної залози з парафінових гістологічних блоків, який включає відбір біологічного матеріалу шляхом одержання з парафінових блоків гістологічних зрізів, розміщення їх на предметному столику та проведення дослідження за допомогою скануючого мікроскопа з енергодисперсивним рентгенівським спектроскопом, який **відрізняється** тим, що як біологічний матеріал використовують гістологічний матеріал з
- 20 підтвердженим вмістом мікрокальцифікатів, а гістологічні зрізи готують товщиною 5-7 мкм, після чого їх розміщують на предметний столик, виготовлений з спектрально чистого вуглецю, і перед проведенням досліджень на скануючому мікроскопі з енергодисперсивним рентгенівським спектроскопом, зрізи витримують 30 хвилин у термостаті при температурі 60 °С та проводять депарафінізацію шляхом двократного покриття зрізів спочатку ксилолом по 5 хв., потім 96 %
- 25 етиловим спиртом по 5 хв., і 70 % етиловим спиртом по 2 хв., після чого промивають дистильованою водою впродовж 2 хв.

Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,

вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601

Додаток В

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

1. Piddubnyi A., Kolomiets O., Danilchenko S. et al. The Prospects of Using Structural Phase Analysis of Microcalcifications in Breast Cancer Diagnostics. *Diagnostics*. 2023. №13, 737. (**Scopus**) (Дисертантом проведено гістологічне, імуногістохімічне, гістохімічне дослідження зразків, дослідження отриманих результатів, підготовка статті до друку).
2. Kovalev V., Diachenko Y., Malyshev V. et al. Comparative features of open source software products for the development of an automated breast cancer diagnostic program. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2019. №7. С. 377–385. (Дисертантом самостійно проведено пошук літературних джерел, їх аналіз та узагальнення).
3. Kolomiets O., Moskalenko R. Breast cancer with microcalcificates: a bibliometric analysis. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2022. №10. С. 300-308 (Дисертантом створений дизайн дослідження, пошук літератури та їх аналіз, узагальнення результатів).
4. Коломієць О. О., Москаленко Р. А. Статистичний аналіз раку грудної залози в Україні та Сумській області за 2015-2020 роки. *Науковий вісник Ужгородського університету*. 2023. №1. С. 75–79. (Дисертантом самостійно проведений пошук, статистичний аналіз показників, аналіз результатів та сформульовані висновки).
5. Kolomiets O., Moskalenko R. Immunohistochemical study of M1 and M2 macrophages in breast cancer with microcalcifications. *Eastern Ukrainian Medical Journal*. 2023. №11. С. 155–163. (Дисертантом проведено імуногістохімічне дослідження, проаналізовані отримані результати, сформульовані).

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. Kolomiets O., Yazykov O., Lukavenko I. et al. The existence of calcifications in breast cancer tissue doesn't affect expression of HER2-neu protein. *European Journal of Pathology*. 2020. 447 (Suppl 1): S 226 (Дисертантом проведено гістологічне та імуногістохімічне дослідження зразків, статистичний аналіз).

7. Kolomiets O., Yazykov O., Moskalenko R. Osteopontin overexpression in invasive ductal breast carcinoma with mineralization. *Biomedical perspectives*. 2021. С. 97 (Дисертантом було проведено імуногістохімічне дослідження, аналіз результатів, сформульовані висновки дослідження).

8. Kolomiets O, Piddubnyi A, Danilchenko S. et al. Morphological and crystal-chemical features of breast cancer microcalcificates. 34rd European Congress of Pathology (3 – 7 September 2022). Virchows Archiv - Berlin, Germany: Springer. 2022. 481 (Suppl 1): S 66 . PS-01-020 (Дисертантом проведено гістохімічне дослідження, аналіз отриманих результатів та сформульовані висновки).

9. Kolomiets O., Piddubnyi A, Danilchenko S. et al. The role of oxalate nanocrystalline for differential diagnostics of the breast pathology. *Twenty third annual conference - YUCOMAT– 2022* (Дисертантом проведено гістохімічне дослідження, аналіз отриманих результатів та сформульовані висновки).

10. Kolomiets O., Piddubnyi A., Moskalenko R. and Stepanenko A. The Structure of Nano-crystalline Apatite From the Breast Cancer. 2022 IEEE 12th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP), 2022, pp. NRA04-1-NRA04-4, doi: 10.1109/NAP55339.2022.9934287 (Дисертантом проведено гістохімічне дослідження зразків, аналіз отриманих результатів та сформульовані висновки).

Додаток Г

АПРОБАЦІЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

1. International Scientific and Practical Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists «BIOMEDICAL PERSPECTIVES» (Sumy, October 16-18, 2019) – тези, стендова доповідь
2. International Scientific Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES II» (Sumy, October 20-22, 2020) – тези, стендова доповідь
3. 32nd European Congress of Pathology - 31/08/2020 – 02/09/2020 – Glasgow, Scotland, UK – тези, електронний постер
4. International Scientific Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists. «BIOMEDICAL PERSPECTIVES III» (Sumy, October 26-28, 2021) – тези, стендова доповідь
5. 33rd European Congress of Pathology 29/08/2021 – 31/08/2021 – Virtual – тези, електронний постер
6. Міжнародна медична конференція Асоціації Патологів України “Наукові дослідження патологоанатомів України: досягнення та перспективи розвитку” 22-23 квітня 2021 – тези, усна доповідь
7. 34th European Congress of Pathology 03/09/2022 – 07/09/2022 – Basel, Switzerland – тези, стендова доповідь
8. Twenty-third Annual Conference YUCOMAT 2022&Twelfth World Round Table Conference on Sintering WRTCS 2022 29/08/2022 – 02/09/2022 – Herceg Novi, Montenegro – тези, стендова доповідь
9. 2022 IEEE 12th International Conference on Nanomaterials: Application & Properties 11/09/2022 – 16/09/2022 – Krakow, Poland – тези, стендова доповідь
10. Дисертаційну роботу заслухано на міжкафедральному семінарі Медичного інституту СумДУ 29 червня 2023 року (протокол № 33/2).