

**Міністерство охорони здоров'я України**  
**Запорізький державний медико-фармацевтичний університет**

Факультет ІІ медичний

УДК 618.19-006.6-074:577.15:577.171.4:577.175.6

Пилипчак Марина Ігорівна

Група 1

**ФЕРМЕНТИ МЕТАБОЛІЗМУ ЕСТРОГЕНІВ ТА ПРОГЕСТЕРОНІВ**  
**ЇХ РЕЦЕПТОРИ ПРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА МАГІСТРА**

зі спеціальності

224 «Технології медичної діагностики та лікування»

Галузь знань 22 «Охорона здоров'я»

Освітня програма «Лабораторна діагностика»

**Науковий керівник:**

Доцент кафедри

онкології та онкохірургії

к. мед.н.,

Щуров Микола Федорович

м. Запоріжжя 2024 р.

**Міністерство охорони здоров'я України**  
**Запорізький державний медико-фармацевтичний університет**

Факультет II медичний  
Кафедра Онкології та онкохірургії  
Галузь знань 22 «Охорона здоров'я»  
Спеціальність 224 «Технології медичної діагностики та лікування»  
Освітня програма «Лабораторна діагностика»  
Освітня програма вищої освіти України Другий магістерський рівень  
Кваліфікація освіти, що присвоюється МАГІСТР

**КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА**  
на тему

**ФЕРМЕНТИ МЕТАБОЛІЗМУ ЕСТРОГЕНІВ ТА ПРОГЕСТЕРОНІВ**  
**ЇХ РЕЦЕПТОРИ ПРИ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

Студент Пилипчак Марина Ігорівна Група 1

КЕРІВНИК РОБОТИ доцент кафедри онкології та онкохірургії, к.мед.н.

Щуров Микола Федорович \_\_\_\_\_  
(підпис)

РЕЦЕНЗЕНТ доцент кафедри онкології та онкохірургії, к.мед.н.,

Мерзляк Сергій Віталійович \_\_\_\_\_  
(підпис)

Робота розглянута на засіданні кафедри (протокол від «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 20 р.  
№ \_\_\_ ) і допущена до захисту.

ЗАВІДУВАЧ КАФЕДРИ онкології та онкохірургії, проф., д.мед.н.

Ковальов Олексій Олексійович \_\_\_\_\_  
(підпис)

м. Запоріжжя 2024 р.

## РЕФЕРАТ

Магістерська робота: 61 ст., 8 рис., 15 табл., 95 джерел.

**Актуальність теми.** У рамках персоналізованої медицини важливо розвивати індивідуалізовані підходи до лікування раку молочної залози (РМЗ): розуміння взаємодії ферментів метаболізму естрогенів та рецепторів естрогенів і прогестеронів (ER і PR) з різними клініко-патологічними змінними (КПТ) може допомогти визначити ефективні стратегії терапії для окремих пацієнток.

**Мета і задачі:** дослідження особливостей клінічного перебігу РМЗ, експресії ER і PR, активності ароматази (AA), стероїд сульфатази (STS) і 17-бета гідроксистероїд дегідрогенази (17HSD) в пухлинній тканині молочної залози, встановлення можливості використання досліджуваних ферментів метаболізму як прогностичних маркерів при оцінці розвитку злоякісного захворювання.

**Об'єкт дослідження:** рак молочної залози I-IV стадій.

**Предмет дослідження:** експресія ER та PR, AA, STS і 17 $\beta$ -HSD.

**Методи дослідження:** клінічні, морфологічні, імуногістохімічні, біохімічні, статистичні.

**Результати дослідження** вказують на превалюючу поширеність РМЗ у жінок старше 50 років (61,2%). Підтверджено важливість естрогену у розвитку РМЗ після менопаузи. Експресія PR та ER корелює з G-статусом, рецидивами, підтверджуючи роль стероїд-рецепторного статусу. Виявлено, що AA не може бути прогностичним маркером, хоча рівень активності ферменту залежить від ступеня злоякісності пухлини. Важливим відкриттям стало можливість використання STS в якості прогностичного біомаркеру рецидивів та метастазування.

**Практичне значення.** Отримані результати допоможуть вдосконалити діагностику та стратегії лікування РМЗ, персоналізуючи підходи до кожного пацієнта. Виявлені кореляції між AA і STS та різними КПТ можуть послужити основою для подальших досліджень та розвитку в галузі онкології.

**Ключові слова:** РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ, РЕЦЕПТОРИ ЕСТРОГЕНУ І ПРОГЕСТЕРОНУ, ФЕРМЕНТИ МЕТАБОЛІЗМУ ЕСТРОГЕНУ, АРОМАТАЗА, СТЕРОЇД СУЛЬФАТАЗА, 17- БЕТА ГІДРОКСИСТЕРОЇД ДЕГІДРОГЕНАЗА

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

|           |   |   |
|-----------|---|---|
| AA        | – | активність ароматази                                |
| АФЕ       | – | активність ферментів естрогену                      |
| ДНК       | – | дезоксирибонуклеїнова кислота                       |
| ІГХ       | – | імуногістохімія                                     |
| КОМТ      | – | катехол-о-метилтрафераза                            |
| НАДФ      | – | нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат               |
| НАДФН     | – | нікотинамід-аденін-динуклеотид-фосфат відновлений   |
| ПХТ       | – | поліхіміотерапія                                    |
| РМЗ       | – | рак молочної залози                                 |
| РНК       | – | рибонуклеїнова кислота                              |
| ТНРМЗ     | – | тричі негативний рак молочної залози                |
| УЗД       | – | ультразвукове дослідження                           |
| ФМЕ       | – | ферменти метаболізму естрогену                      |
| цАМФ      | – | циклічний аденозинмонофосфат                        |
| BRCA      | – | ген раку молочної залози                            |
| EGFR      | – | рецептор епідермального фактора росту               |
| ER        | – | рецептори естрогену                                 |
| GST       | – | глутатіон-S-трансфераза                             |
| GLOBOCAN  | – | Всесвітня організація спостереження за раком        |
| HER-2/neu | – | рецептор людського епідермального фактора росту-2   |
| Ki67      | – | маркер проліферативної активності пухлинної клітини |
| PR        | – | рецептори прогестерону                              |
| RANK      | – | рецептор активації ядра фактора-кВ                  |

|         |   |  |
|---------|---|--|
| RANKL   | – | ліганд рецептора активації ядра фактора-κВ |
| STS     | – | стероїд сульфатаза                         |
| 17β-HSD | – | 17-бета гідроксистероїд дегідрогеназа      |

## ЗМІСТ

|   |    |
|---|----|
| ВСТУП.....  | 7  |
| РОЗДІЛ 1  |    |
| ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....   | 11 |
| 1.1. Епідеміологічні особливості раку молочної залози. Фактори ризику .....   | 11 |
| 1.2. Патогенез, клінічні та морфологічні особливості раку молочної залози ...                                       | 13 |
| 1.3. Молекулярно-генетичні аспекти раку молочної залози .....   | 15 |
| 1.4. Роль естрогенів і прогестеронів та їх рецепторів у розвитку раку молочної залози.....                          | 16 |
| 1.4.1. Роль стероїдних гормонів та їх рецепторів у нормі.....   | 16 |
| 1.4.2. Роль естрогену та рецептора естрогену у розвитку раку молочної залози.....                                   | 20 |
| 1.4.3. Роль прогестерону та його рецептору у розвитку раку молочної залози  | 22 |
| 1.4.4. Ферменти метаболізму естрогену при раку молочної залози .....  | 22 |
| 1.4.5. Зв'язок ферментів метаболізму естрогенів з клініко-морфологічними параметрами при раку молочної залози ..... | 26 |
| РОЗДІЛ 2  |    |
| МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ .....   | 29 |
| 2.1. Дизайн дослідження.....  | 29 |
| 2.2. Методи обстеження хворих, залучених до дослідження .....   | 37 |
| 2.3. Визначення рецепторного статусу пухлини.....   | 39 |
| 2.4. Визначення активності ферментів метаболізму естрогену .....  | 40 |
| 2.4.1. Визначення активності ароматази.....   | 40 |
| 2.4.2. Визначення вмісту білка за методом Лоурі .....   | 41 |
| 2.4.3. Визначення активності стероїд сульфатази .....   | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 2.4.4. Визначення активності 17 бета-гідроксистероїд дегідронази.....  | 42 |
| 2.5. Статистична обробка результатів.....  | 43 |
| РОЗДІЛ 3   |    |
| РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ .....  | 44 |
| 3.1. Дослідження експресії рецепторів стероїдних гормонів та HER2/neu у пухлинній тканині жінок з раком молочної залози .....  | 44 |
| 3.2. Дослідження активності ароматази у пухлинній тканині молочної залози, незмінній тканині молочної залози та регіонарних лімфатичних вузлах .....                           | 47 |
| 3.3. Дослідження активності стероїд сульфатази та 17β-гідроксистероїд дегідрогенази у пухлинній тканині молочної залози .....  | 53 |
| 3.4. Прогностичне значення активності ферментів метаболізму естрогенів та рецепторів естрогенів та прогестерону при раку молочної залози в рамках проведеного дослідження..... | 54 |
| ВИСНОВКИ.....  | 59 |
| ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....  | 61 |
| СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ .....   | 62 |

## ВСТУП

Рак молочної залози (РМЗ) займає провідне місце у загальній структурі злоякісних новоутворень серед жіночого населення [1]. Вивчення цього захворювання вимагає ретельного аналізу різноманітних факторів та механізмів його розвитку і прогресу. Особливо важливим у цьому контексті є гормональний дисбаланс, який визначається як ключовий у патогенезі даного захворювання. Глибокий аналіз взаємозв'язку між гормональним дисбалансом та формуванням РМЗ стає неодмінною складовою розвитку наукових знань у цій області та може сприяти вдосконаленню стратегій профілактики та терапії [2].

РМЗ характеризується патологічним ростом клітин у тканині молочної залози [3]. Він є найбільш часто діагностованим раком у жінок і другою за поширеністю причиною смерті від онкологічних захворювань у всьому світі. Інцидентність цього виду раку варіює в різних популяціях, враховуючи різноманітні фактори ризику, такі як вік, сімейний анамнез та генетичні мутації. Варто відзначити, що РМЗ суттєво виходить за межі фізичних проявів, маючи вагомий вплив на психічний стан та загальну якість життя пацієнтів [4].

Детальне вивчення гормонального дисбалансу, зокрема естрогенів та прогестеронів, в контексті РМЗ займає важливе місце у сучасній науковій парадигмі [5]. Естроген, який в основному синтезується в яєчниках, відіграє критичну роль у рості та розвитку молочної тканини. Не менш важливий прогестерон регулює менструальний цикл та розвиток грудей [6]. Порушення тонкої гармонії цих гормонів безпосередньо пов'язано із виникненням та прогресією РМЗ, а дослідження ролі стероїдних рецепторів відіграє ключову роль в аналізі цієї патології [7].

Наявність або відсутність гормональних рецепторів допомагає класифікувати підтипи РМЗ та має прогностичне значення. Численними дослідженнями доведено, що статус рецепторів естрогену (ER) і прогестерону (PR) може впливати на агресивність пухлини, відповідь на лікування та загальний прогноз. Так, пацієнти



із естроген- та прогестерон-позитивним РМЗ, зазвичай, мають сприятливіший прогноз, оскільки цей тип раку проявляє вищу чутливість до гормональної терапії [8]. Використання антагоністів ER, таких як тамоксифен, чи інгібіторів ароматази є ефективними методами лікування, спрямованими на зниження гормонального впливу в організмі та пригнічення прогресії захворювання [9].

На сьогоднішній день, серед факторів, які впливають на ризик розвитку РМЗ особливе значення надається ферментам метаболізму естрогену, серед яких ароматаза, як вважається, займає ключове місце через свою участь в перетворенні андрогенів в естроген. Показано, що цей фермент сприяє збільшенню концентрації естрогенів в тканинах і може створювати сприятливі умови для ініціації та прогресії онкологічного процесу [10]. Не торкаючись ролі інгібіторів ароматази при терапії РМЗ, важливо відзначити окремий напрямок наукових досліджень щодо ролі цього ферменту як прогностичного фактору. Дослідження в цьому напрямку є динамічними і продовжують розвиватися, а перспективи включають в себе уточнення молекулярних механізмів взаємодії ароматази з раковими клітинами.

Важливими компонентами модуляції локалізованих рівнів естрогену є стероїд сульфатаза (STS) та 17-бета гідроксистероїд дегідрогеназа ( $17\beta$ -HSD). STS функціонує для перетворення сульфатованих стероїдів у їх нессульфатовані форми [11]. Це важливо, оскільки багато стероїдів циркулюють у своїй сульфатованій формі у значному надлишку порівняно з некон'югованими формами, тому присутність STS вказує на здатність пухлинної клітини потенційно використовувати значно збільшений запас стероїдів. З іншого боку,  $17\beta$ -HSD відіграє ключову роль у конвертації естрону, менш активної форми естрогену, у більш біологічно активний естрадіол [12].

Попередні дослідження впливу вищезазначених ферментів на РМЗ виявили, що швидше за все вони діють через альтернативне надходження естрогену до тканини молочної залози [13]. Базуючись на цьому, впродовж останній трьох десятиліть розробляються інгібітори STS як потенційні терапевтичні агенти при

PM3, а перше покоління цих агентів (STX64/Irosustat) в клінічних дослідженнях показало багатообіцяючі результати [14].

Таким чином, розуміння взаємодії ферментів метаболізму та рецепторів стероїдних гормонів має потенціал виявити нові точки втручання для лікування та розробки нових стратегій профілактики РМЗ. Детальніші дослідження можуть допомогти розкрити їх роль у патогенезі захворювання та вибудувати основу для подальшого розвитку у сфері персоналізованого лікування цього виду раку.

**Мета роботи** – вивчення клінічного перебігу раку молочної залози, ролі рецепторів естрогену і прогестерону, а також ферментів метаболізму естрогенів (ароматази, стероїд сульфатази і 17-бета гідроксистероїд дегідрогенази) у пухлинній тканині молочної залози та їхнього можливого використання як прогностичних маркерів для оцінки розвитку злоякісного захворювання.

#### **Завдання дослідження.**

1. Визначити епідеміологічні особливості раку молочної залози.
2. Встановити взаємозв'язок між стероїд-рецепторним статусом пухлини молочної залози та різними клініко-патологічними змінними: віком пацієнток, розміром і ступенем злоякісності первинної пухлини, випадками рецидиву захворювання.
3. На основі аналізу взаємозв'язку між активністю ароматази та різними клініко-патологічними змінними оцінити можливість використання якісного і/або кількісного показника активності ферменту як незалежного прогностичного маркеру у хворих на рак молочної залози.
4. Оцінити значення стероїд сульфатази та 17-бета гідроксистероїд дегідрогенази як факторів прогнозу розвитку рецидивів раку молочної залози.

*Об'єкт дослідження:* рак молочної залози I-III стадій.

*Предмет дослідження:* експресія рецепторів естрогену і прогестерону, активність ароматази, стероїд сульфатази і 17-бета гідроксистероїд дегідрогенази.

*Методи дослідження:* клінічні, морфологічні, імуногістохімічні, біохімічні, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Підтверджено роль естрогену у розвитку раку молочної залози у жінок після менопаузи.

Підтверджено взаємозв'язок між активністю ароматази в пухлинній тканині молочної залози та різними клініко-патологічними змінними. Результати дослідження дозволили заключити, що активність ферменту не може бути рекомендована до застосування в якості незалежного прогностичного маркера.

Встановлено, що експресія стероїд сульфатази може використовуватися як прогностичний маркер розвитку рецидивів раку молочної залози.

**Практичне значення отриманих результатів.** Визначення вікових, гістологічних та молекулярно-біологічних особливостей раку молочної залози дозволяє вдосконалити стратегії у підходах до діагностики та лікування, сприяючи точнішій стратифікації ризиків та вибору оптимальних терапевтичних стратегій.

Практичні наслідки отриманих результатів дослідження стосовно підвищеного ризику розвитку раку молочної залози у жінок понад 50 років полягають у вдосконаленні стратегій скринінгу, підвищенні усвідомленості громадськості та активності у профілактичних заходах.

Визначення активності ароматази в пухлинній тканині раку молочної залози виявився рутинним і складним методом, який на сьогоднішній день не має однієї загальноприйнятої методики проведення. Виявлена відсутність активності ароматази у більш ніж 20% досліджуваних зразків пухлин вказує на те, що підходи, спрямовані на блокування цього ферменту можуть бути менш ефективними у деяких пацієнтів. Це відкриття може стати основою для подальших наукових досліджень та розвитку нових підходів у лікуванні онкологічних захворювань.

Важливого практичного значення набуває доведена в роботі можливість детальніше оцінювати перебіг та підвищити точність прогнозування ймовірності випадків рецидиву за допомогою включення до імуногістохімічного дослідження, окрім стероїдних рецепторів, визначення активності STS та 17 $\beta$ HSD2 у пухлинній тканині молочної залози. Такий підхід значно розширить можливості персоналізованого лікування пацієнтів, зокрема з вираженою гетерогенністю раку молочної залози.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Епідеміологічні особливості раку молочної залози. Фактори ризику

Згідно даним Національного канцер-реєстру, протягом останнього десятиліття рівень захворюваності населення України на злоякісні новоутворення має приріст менше 1% [15]. Такі статистичні дані пов'язані з рядом подій, що мали місце у нашій країні, починаючи з 2020 року. Так, у 2020 році в результаті зменшення кількості звернень за онкологічною допомогою через пандемію COVID-19 відбулося різке зниження цього показника на 18,2%. Кількість виявлених нових випадків захворювання на рак в Україні зменшилась на 27,1 тис. у порівнянні з попередніми роками. У 2021 році рівень захворюваності зріс на 6,0% порівняно з попереднім роком, але залишався нижчим на 13,3% в порівнянні з передпандемічним 2019 роком. А у 2022 році широкомасштабні воєнні дії на території України вплинули на роботу закладів охорони здоров'я та систему реєстрації: кількість виявлених нових випадків захворювання на злоякісні новоутворення в Україні скоротилась на 22,3% (на 26,8 тис.).

Не зважаючи на те, що оперативні дані за минулі роки слід розглядати лише як сигнальні, РМЗ залишається першим в когорті онкологічних захворювань дорослого жіночого населення України. Цікаво, що у всьому світі рівень захворюваності на цей вид раку різний. Показники низькі в менш розвинених країнах і найвищі в більш розвинених країнах. РМЗ пов'язаний з віком: лише 5% усіх випадків РМЗ зустрічаються у жінок віком до 40 років.

Згідно даним «Всесвітньої організації спостереження за раком» (Global Cancer Observatory, GLOBOCAN) у дванадцяти регіонах світу щорічні стандартизовані за віком показники захворюваності на 100 000 жінок є такими (рис. 1.1.1) [16]:

- Східна Азія – 18 на 100 000 жінок;
- Південна Центральна Азія – 22 на 100 000 жінок;
- Африка на південь від Сахари – 22 на 100 000 жінок;

- Південно-Східна Азія – 26 на 100 000 жінок;
- Північна Африка – 28 на 100 000 жінок;
- Західна Азія – 28 на 100 000 жінок;
- Південна і Центральна Америка – 42 на 100 000 жінок;
- Східна Європа – 49 на 100 000 жінок;
- Південна Європа – 56 на 100 000 жінок;
- Північна Європа – 73 на 100 000 жінок;
- Океанія – 74 на 100 000 жінок;
- Західна Європа – 78 на 100 000 жінок;
- Північна Америка – 90 на 100 000 жінок.

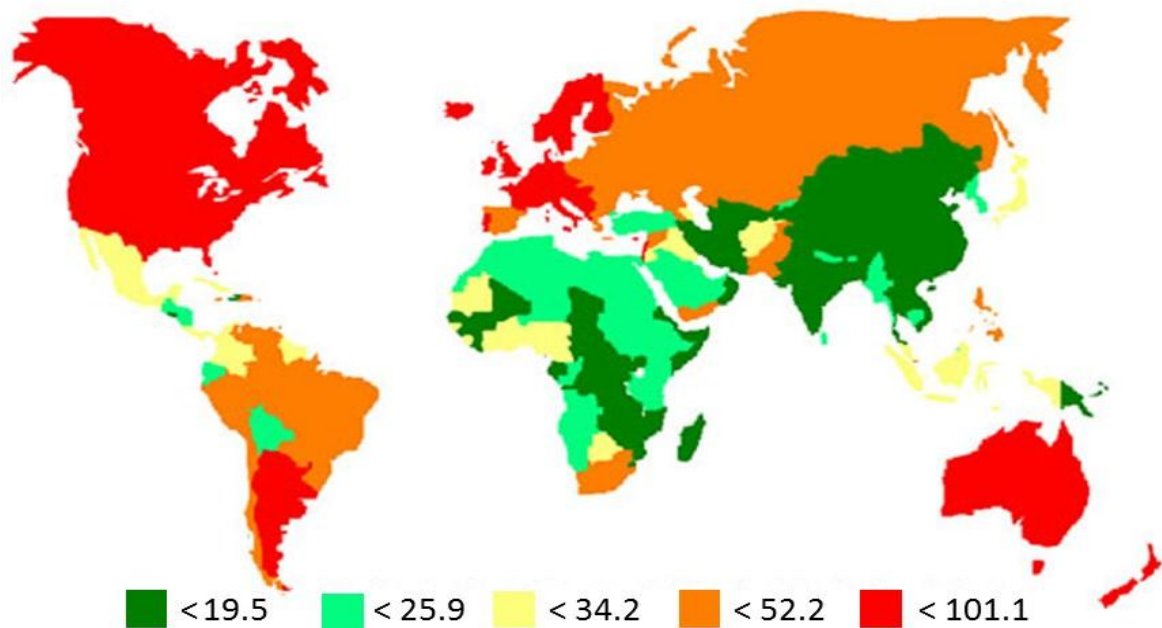


Рисунок 1.1.1. Стандартизований рівень захворюваності на рак молочної залози на 100 тис. жінок (згідно статистичним даним GLOBOCAN за 2022 р. [16])

Прогнозується, що до 2040 року кількість нових випадків РМЗ зросте більш ніж на 40%, до 3 мільйонів випадків щороку. Так само очікується, що смертність

від РМЗ зросте більш ніж на 50%, з 685 000 у 2020 році до 1 мільйона у 2040 році. Особливо велике відносне зростання спостерігатиметься в країнах з перехідною економікою, особливо в країнах з низьким індексом людського розвитку, де кількість нових випадків і смертей подвоїться до 2040 року (від 110 000 до 216 000 і з 59 000 до 116 000 відповідно). Якщо у 2020 році 18,4% випадків РМЗ та 30,1% смертей припадали на країни з перехідною економікою, то до 2040 року ця частка зросте до 22,2% та 35,2%, відповідно. Цей прогноз пов'язаний виключно зі зростанням і старінням населення і може бути додатково змінений змінами в рівнях захворюваності [16].

Високі показники захворюваності на РМЗ відображають тривалу високу поширеність репродуктивних, гормональних і поведінкових факторів ризику. Встановлено, що факторами ризику розвитку РМЗ є ранній вік менархе, пізніший вік менопаузи, пізній вік перших пологів, низка кількість народжування, відмова від грудного вигодовування, замісна гормональна терапія в менопаузі, оральні контрацептиви, а також вживання алкоголю, надмірна маса тіла та відсутність фізичної активності [17]. Починаючи з 2007 року в кількох країнах з високим рівнем доходу в Північній Америці, Європі та Океанії відмічалось зростання рівня захворюваності на РМЗ в пре- та постменопаузі. Здебільшого це зростання пов'язано зі збільшенням виявлення невеликих пухлин на ранніх стадіях з дуже хорошим прогнозом у країнах із добре налагодженими програмами скринінгу. Виявлено збільшення нових випадків повільно зростаючих пухлин з позитивним рецептором естрогену, в той час як частота нових випадків з негативним рецептором естрогену знижується. Різні тенденції щодо захворюваності на естроген-рецептор-позитивний РМЗ були пов'язані з подвійним впливом певних екологічних факторів ризику, таких як ожиріння [18].

## **1.2. Патогенез, клінічні та морфологічні особливості раку молочної залози**

РМЗ починається з появи поодинокого щільного, неправильної форми безболісного вузла або затвердіння (інфільтрату) у тканині залози. Гіперемія шкіри

над пухлиною – це локальний лімфостаз унаслідок ураження лімфатичного сплетення субареолярної зони. Найчастіше раковий вузол локалізується у верхньозовнішньому квадранті грудної залози [19]. Пухлина великих і середніх розмірів деформує залозу. Постійно збільшуючись у розмірах, пухлина проростає у шкіру, фасції, м'язи і грудну стінку. Нарівні з місцевим ростом ракові клітини поширюються молочними протоками, лімфатичним шляхами і кровоносними судинами. При цьому пухлинні клітини можуть або рости у вигляді безперервного тяжу в отворі судини або відриватися від основної маси й у вигляді емболу заноситися течією лімфи чи крові у віддалені органи й утворювати метастази. Найчастіше метастази розвиваються у лімфатичних вузлах (пахвових, під- і надключичних, пригрудинних), кістковій системі, легенях, печінці, плеврі.

Виділення із соска у жінок віком понад 50 років з більшою імовірністю вказують на злоякісний ріст [20]. Серозні виділення лише у 5% випадків свідчать про РМЗ, сукровичні – у 15%, кров'янисті – у 20%, а водянисті – у 50% [21].

Дифузні форми РМЗ:

*Набряково-інфільтативний рак:* уражена грудна залоза збільшена у розмірах, шкіра напружена і має вигляд лимонної шкуринки, пальпаторно відмічаються дифузне набрякове ущільнення залози, пастозність.

*Панцирний рак* характеризується пухлинною інфільтрацією шкіри і грудної стінки. Шкіра з часом стає щільною, пігментованою, сама грудна залоза також ущільнюється, зменшується в розмірах, підтягується догори і разом з інфільтративно-індуративним ураженням прилеглих тканин, ніби панциром, покриває грудну стінку. Серед дифузних форм лише панцирний рак має торпідний перебіг.

*Бешихоподібний рак:* на шкірі грудної залози наявні ділянки інтенсивної гіперемії з нерівними контурами, які нагадують еритематозну стадію бешихи. Почервоніння зумовлене раковою інфільтрацією капілярів і лімфатичних судин шкіри. Для цієї форми раку характерні гострий початок, висока злоякісність і швидке метастазування.

*Маститоподібний рак:* грудна залоза збільшена, щільна, відмічаються гіперемія шкіри й місцеве підвищення температури. У товщі залози можуть пальпуватись дифузні ущільнення. Інфільтрація швидко охоплює всю залозу й поширюється на прилеглі тканини, з'являються регіонарні й віддалені метастази.

Інші форми РМЗ:

*Карцинома Перджета* клінічно нагадує прояви односторонні екземи соска й навколососкового кружальця.

*Первинно-множинний рак* характеризується одночасним ураженням кількох пухлинами однієї чи обох грудних залоз.

*Саркоми* становлять менше 1% від усіх злоякісних пухлин грудної залози.

### **1.3. Молекулярно-генетичні аспекти раку молочної залози**

Значна частина випадків РМЗ (5–10%) корелює з генетичними мутаціями, зокрема генами сімейства BRCA (англ. BReast CAncer) – BRCA1 і BRCA2, p53 і PTEN. Генетична визначеність цих мутацій зумовлює високий ризик розвитку раку (до 80%), особливо у пацієток перед менопаузою. BRCA1 розташований на довгому плечі хромосоми 17, тоді як BRCA2 розташований на довгому плечі хромосоми [22].

Не зважаючи на те, що 5-10% випадків РМЗ пов'язані з конкретними генами, такими як BRCA1 і BRCA2, сімейний анамнез також може свідчити про спільний вплив зовнішніх чинників [23]. З точки зору етичних і юридичних аспектів, генетичний скринінг рекомендується лише для наукових досліджень, проте він може використовуватися у випадку наявності РМЗ у сімейному анамнезі.

Поліморфізми у генах, які можуть збільшити шанс виникнення РМЗ, взаємодіють з різними факторами, як зовнішніми, так і внутрішніми. Таким чином саме ці аспекти визначають 90-95% спорадичних випадків розвитку захворювання. Сімейні раки зазвичай виникають у молодших пацієнтів, часто є мультифокальними або двосторонніми та мають гірший прогноз розвитку захворювання порівняно зі спорадичними випадками, які переважно є



односторонніми, зустрічаються у пацієнтів старшого віку та мають кращі результати [17].

У 1987 році було виявлено, що експресія протоонкогену людського епідермального фактора росту-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2, HER-2/neu) посилюється і надмірно виражена у 20–30% випадків інвазивного РМЗ, а також асоціюється з поганим прогнозом та зменшенням показників виживання [24]. Окрім РМЗ, цей білок фактора росту надмірно експресується і при раку яєчників, легені, шлунка та порожнини рота [25–28]. Крім того, вважається, що HER-2/neu-позитивність передбачає ймовірність резистентності або чутливості до деяких традиційних гормональних препаратів, такі як тамоксифен [29]. Було показано, що герцептин (трастузумаб), рекомбінантне гуманізоване моноклональне антитіло до HER-2/neu, покращує результати лікування жінок з метастатичним РМЗ як в монотерапії, так і в комбінації з хіміотерапією [30].

Було відмічено, що у певних категоріях населеннях, переважно у низьких соціально-економічних групах, зустрічається тричі негативний РМЗ (ТНРМЗ) [31], який є негативним для рецепторів естрогену, прогестерону та HER-2/neu. Він становить до 20% від всіх випадків РМЗ та наразі не має стандартного лікування, асоціюється з більшою кількістю рецидивів, швидшим ростом та гіршим прогнозом в порівнянні з іншими видами РМЗ. Чутливий лише до хіміотерапії. На додаток до цього, TNBC пов'язаний з інактивацією BRCA1 і надмірною експресією рецептора епідермального фактора росту (EGFR), що робить його чутливим до анти-EGFR терапії. Наразі розробляються нові молекулярно-цільові методи лікування щодо цього виду раку, які все ще проходять випробування.

#### **1.4. Роль естрогенів і прогестеронів та їх рецепторів у розвитку раку молочної залози**

##### ***1.4.1. Роль стероїдних гормонів та їх рецепторів у нормі***

Стероїдні гормони та їх рецептори належать до ключових регуляторів біологічних процесів, включаючи розвиток статевих органів, вагітність, щільність

кісткової тканини, мобілізацію холестерину, функціонування мозку та серцево-судинної системи [32–33]. До них відносяться естрогени, прогестерон і андрогени, які належать до групи структурно споріднених гормонів, так звані статеві гормони, які виділяються в системний кровотік наднирковими і статевими залозами. Вони утворюються з однієї вихідної молекули холестерину шляхом реакції, що каталізується декількома ферментами (рис. 1.4.1.1). Утворені гормони вивільнюються у кров та надходять через плазматичну мембрану у свої клітинні мішені шляхом зв'язування з високоафінними рецепторними білками, відомими як рецептори стероїдних гормонів.

Синтез естрогенів відбувається, головним чином, у яєчниках та жовтому тілі, а також у молочній залозі, надниркових залозах, насінниках та плаценті. Яєчники, особливо клітини теки фолікулів, є основним джерелом естрогенів у невагітних жінок. При оперативному видаленні статевих залоз кора надниркових залоз частково компенсує їхню естрогеноутворювальну функцію. Яєчники виробляють щодобово близько 0,25-0,35 мг первинного естрогену – 17-Р-естрадіолу, з піком виробництва між 10-22 днями циклу. Синтез естрогенів – це складний процес, який регулюється гонадотропними гормонами гіпофіза та включає у себе послідовні реакції, розпочинаючи з холестерину та відбуваючись переважно в надниркових залозах.

Не менш важивий процес – синтез прогестерону – відбувається в яєчниках, жовтому тілі, молочній залозі, надниркових залозах, плаценті та навіть у мозку. В яєчниках, зокрема в корі та клітинах його структури, прогестерон утворюється з холестерину під впливом гонадотропних гормонів передньої частки гіпофіза (фолікулостимулюючого та лютеїнізуючого гормону). Після ініціації цього процесу холестерин перетворюється в прегненолон, а далі за участю різних ферментів і реакцій утворюється прогестерон (рис. 1.4.1.1). Цей гормон відіграє важливу роль у жіночому репродуктивному циклі та підтримує вагітність, а також у розвитку та прогесії РМЗ.

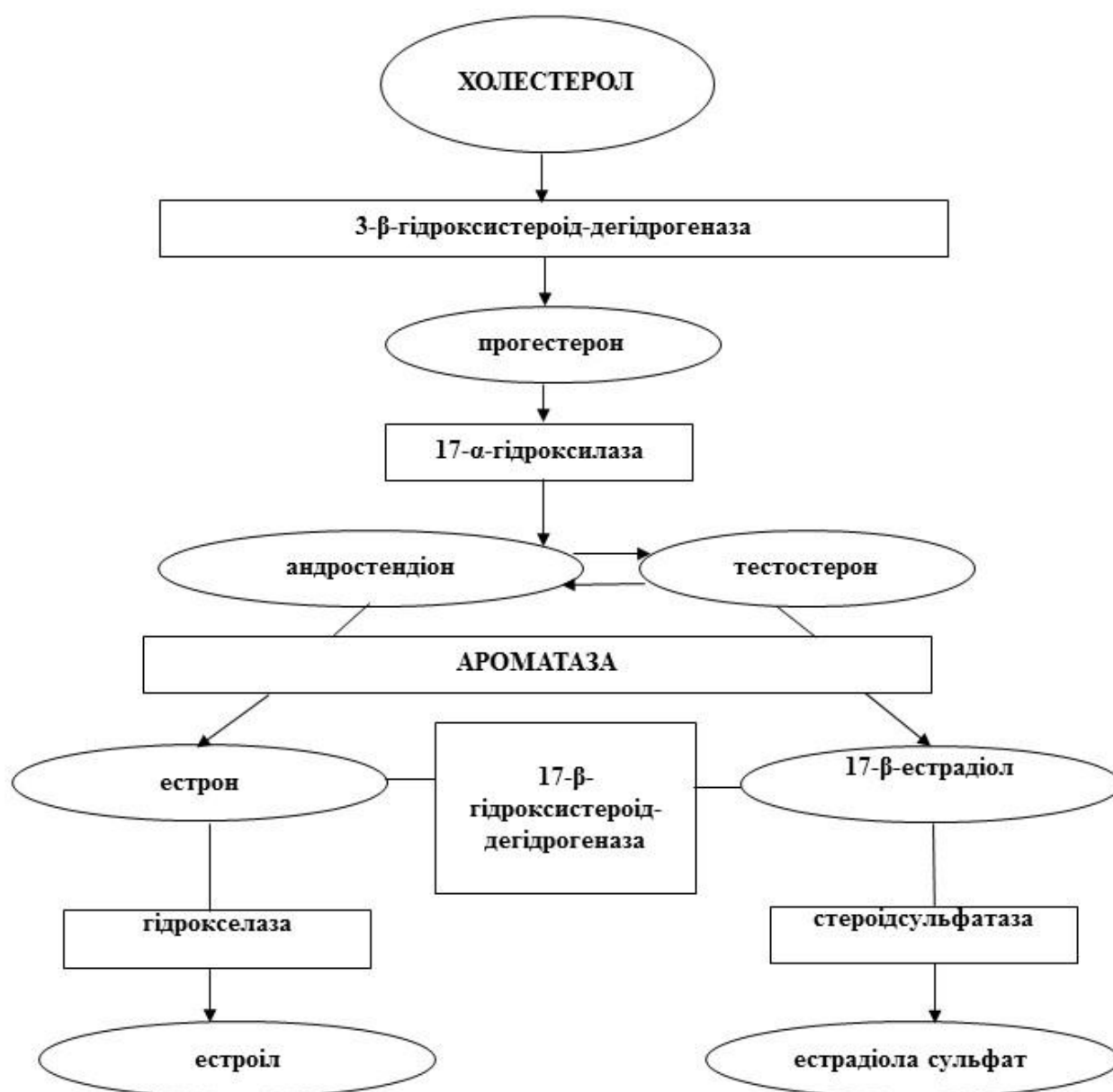


Рисунок 1.4.1.1. Основні шляхи біосинтезу та метаболізму стероїдів у яєчнику

Сучасні дослідження чітко визначають вирішальну роль естрогену та його рецептора у процесі розвитку та підтримки роботи жіночої репродуктивної системи – підготовки структурних компонентів статевої системи до розмноження, прискорення синтезу білка, РНК, ДНК, стимуляції проліферації та диференціювання тканин-мішеней, регуляції циклічності менструального циклу. Варто відзначити участь естрогенів у розвитку молочної залози, яка може тривати

протягом усього життя, а у деяких випадках цей процес залишається незавершеним. У цей час відомо, що прогестерон приймає активну участь у менструальному циклі, вагітності й ембріогенезі людини та інших видів тварин, забезпечуючи своєрідне зв'язування з рецепторами прогестерону. Відомо, що PR може модулювати дію ER [34]. Крім того, PR є регульованим цільовий геном ER, що робить його експресію залежною від естрогену. Останні дослідження вказують на роль PR як прогностичного маркеру виживаності при РМЗ [35].

Окрім впливу на жіночу репродуктивну систему, естрогени також впливають на функції щитовидної та підшлункової залоз як прямим, так і непрямим чином через передню частку гіпофіза [36]. Невеликі дози естрогенів стимулюють функцію щитовидної залози, але при тривалому постачанні великих доз гормонів, залоза залишається у стані спокою. Значущий анаболічний вплив естрогенів проявляється у збільшенні синтезу білків і утриманні азоту в організмі. Естрогени регулюють обмін ліпідів, запобігаючи розвитку атеросклерозу [37]. Основний процес розпаду естрогенів відбувається у печінці, де вони метаболізуються та інактивуються. Естрогени також впливають на рівновагу води в організмі, що проявляється зміною ваги жінки під час менструального циклу [38].

На основі експериментальних досліджень за участю мишей, з використанням культури клітин молочної залози людини та клінічних досліджень виявлено, що естроген і прогестерон є основними проліферативними стероїдними гормонами в епітелії молочної залози, виступаючи сигнальними молекулами [39]. Естрадіол та епітеліальна передача сигналів ER $\alpha$  є необхідними для росту та розвитку протоків молочних залоз на ранніх стадіях статевого дозрівання, при цьому участь прогестерону/PR на цьому етапі є не обов'язковою. Взаємодія прогестерону зі своїм рецептором є необхідною в епітеліальному відділі для подовження протоку та бічного розгалуження за підвищених рівнів естрогену. На ранніх термінах вагітності сигнали PR можуть стимулювати значне розширення епітеліального відділу, а для альвеолярної диференціації на середньому та пізньому періодах вагітності прогестерон є необхідним. На кінцевому терміні вагітності прогестерон

переходить на інгібування термінальної диференціації, а його видалення є необхідним для ініціації лактації [32].

#### **1.4.2. Роль естрогену та рецептора естрогену у розвитку раку молочної залози**

Статистика свідчить, що майже 70% випадків РМЗ є гормон рецептор-позитивними, де експресія ER та/або PR у ракових клітинах асоціюється з ростом первинної пухлини та процесом метастазування [40].

Характерною ознакою передракових уражень і пухлин молочної залози є збільшення частки проліферуючих ER/PR-позитивних клітин під час канцерогенезу молочної залози, а потім перехід від паракринного до аутокринного режиму регуляції стероїдними гормонами [32]. В експериментальних дослідженнях було показано, що клітини, які експресувались як ER $\alpha$ , так і асоційований з проліферацією антиген Ki67 (маркер проліферативної активності пухлинної клітини, білок), збільшувалися під час утворення пухлин у грудях [41]. Тому на сьогоднішній день залишається відкритим питання чи є це важливим кроком від гіперплазії до протокової карциноми *in situ* або інвазивного РМЗ або чи є це важливим процесом для гормононегативного канцерогенезу молочної залози.

Естрогени впливають на канцерогенез на трьох етапах: ініціації, промоції та прогресії [42]. Механізми гормонального канцерогенезу стосуються складних генетичних змін та пошкоджень, в яких естрогени та їх метаболіти виступають як канцерогени. Є дві основні теорії: посиленої проліферації або промоторний тип канцерогенезу та утворення ДНК-аддуктів або генотоксичний тип канцерогенезу.

У контексті промоторного типу гормонального канцерогенезу, естрогени при взаємодії з рецепторами, ініціюють сигнальні каскади, сприяючи збільшенню мітотичної активності тканин-мішеней та обмеженню апоптозу. Естрогени активують протоонкоген c-myc та збільшують експресію цикліну-D, сприяючи проліферації клітин РМЗ. В процесі проліферації, керованої естрогеновими рецепторами, зростає кількість мутацій, а також обмежується час, необхідний для репарації ушкоджень. Одноланцюгова ДНК в процесі мітозу більш схильна до

пошкоджень, збільшується ймовірність виникнення дуплікації гена. Збільшення клітинного поділу необхідне для активації онкогенів через мутації та інактивації генів-супресорів, призводячи до втрати гетерозиготності та виходу клітин із нормального контролю [43].

За генотоксичним типом гормонального канцерогенезу, естрадіол, що не взаємодіє з рецепторами, під час метаболізму перетворюється на катехол естрогени [44]. Унаслідок цього утворюються вільні радикали, такі як естроген-хінони і семіхінони, які викликають подальше утворення інших вільних радикалів, таких як супероксид аніон-радикал та перекис ліпідів. Локальне утворення естрогенів у молочній залозі може утворювати рівні естрадіолу, достатні для генотоксичного канцерогенезу та запуску ендogenous мутагенних шляхів.

Самі естрогени або їх похідні, такі як катехолестрогени, можуть викликати пряме ушкодження ДНК. Зв'язування хінонів з гуаніном призводить до утворення кон'югатів, які видаляються з ДНК. Після цього виникають точкові мутації під час реплікації. Хінони можуть відновлюватися з утворенням генотоксичного 4-гідроксиестрадіолу, який у поєднанні з іншими естрогенами, приймає участь у редокс-циклі, утворюючи вільні радикали та пошкодження ДНК. Катехолестрогени формують стабільні аддукти з ДНК, які залишаються до репарації. Деривати 3,4-хінонів утворюють депуринізовані аддукти, що залишають нерепаровані безпуринові ділянки, сприяючи генотоксичному ушкодженню [45].

Вплив промоторного чи генотоксичного шляху залежить від ендogenous і екзогенних факторів. Ці шляхи можуть взаємодіяти синергічно або адитивно. Частота гормон-індукованих ушкоджень ДНК може збільшуватися за певних умов, наприклад, при надмірній гормональній стимуляції тканини та взаємодії з факторами зовнішнього середовища, такими як тривале куріння. Актуальні дані та дослідження підтримують генотоксичну теорію гормонального канцерогенезу, показуючи здатність естрогенів до ушкодження ДНК та формування стабільних аддуктів.

### ***1.4.3. Роль прогестерону та його рецептору у розвитку раку молочної залози***

Виявлено, що підвищений вплив прогестерону збільшує ризик розвитку РМЗ та сприяє утворенню пухлин із негативними гормональними рецепторами на додаток до пухлин із позитивними гормональними рецепторами. Жінки у постменопаузі, у яких виявлено підвищений рівень прогестерону в крові, мають на 16% більший ризик розвитку РМЗ [46]. У більшості тканин-мішеней прогестерон є прямим геном, що індукує естроген, взаємодіючи з білками і впливаючи на біологічні процеси. Також вивчалось, що прогестерон може впливати на активність генів, що контролюють ріст пухлини і може регулювати загальний ріст пухлини. Гормон медроксипрогестерону ацетат може збільшувати чутливість епітеліальних клітин до пухлин молочної залози за допомогою ліганда фактору некрозу пухлин або рецептору активації ядра фактора-кВ (RANKL) та лігандного шляху RANKL/RANK. Цей шлях відповідає за проліферацію та розвиток пухлин молочної залози [47].

У роботі [48] ученими було вивчено генетичний профіль РМЗ на основі 65 хірургічних зразків тканини молочної залози людини від 42 осіб з використанням комплементарних мікрочіпів ДНК. Вони визначили різні підтипи раку, зокрема люмінальний В, що є ER-позитивним і вирізняється підвищеною проліферацією.

Алгоритм PAM50 і вивчення білка PR допомагають відрізнити підтипи РМЗ. Висока експресія PR є важливим маркером прогнозу, особливо для пухлин з кращим прогнозом (люмінальний А). Виявлено, що пухлини ER+/PR- мають схожі характеристики як з ER+/PR+, так і з ER-/PR-, вони відповідають люмінальному В типу раку з гіршим прогнозом [49].

### ***1.4.4. Ферменти метаболізму естрогену при раку молочної залози***

Ферменти метаболізму естрогенів відіграють ключову роль у розвитку та прогресії РМЗ, відображаючи складний молекулярний ландшафт цього процесу. Ці ферменти включають ароматазу, фермент, який перетворює андрогени в естрогени, зокрема, конвертуючи тестостерон у естрадіол. Висока активність ароматази в

організмі виявлена у 60-70% випадків РМЗ і приблизно у 80-90% випадків – активність STS [50]. Показано, що експресія ароматази максимальна у пухлинній тканині та прилеглий до пухлини нормальної тканини, порівняно з іншими ділянками молочної залози. Мутації у будь-якій із відповідних ділянок гена ароматази можуть призводити до гіперекспресії цього ферменту в тканині молочної залози. На активність даного ферменту впливає наявність стромального компонента [51].

Для ароматази, як і багатьох інших ферментів, характерні генетичні поліморфізми. Виявлено, що у хворих на РМЗ один із ізоформних алелей гена CYP19 з найбільшою кількістю тетрануклеотидних повторів (AI) відзначається у 2,5 рази частіше, ніж у здорових жінок. Також виявлено, що аллель AI виявляється найчастіше у хворих, новоутворення молочної залози яких містили рецептори естрогенів або рецептори прогестерону. Також знайдено, що поліморфізм гена CYP19, обумовлений з С-Т заміною в 10 екзоні пов'язаний з високою активністю даного ферменту. Частота високоактивних генотипів була значно збільшена у пацієнтів з РМЗ, переважно з III та IV стадіями хвороби та розміром пухлини більше 5 сантиметрів [52].

Уперіод менопаузи рівень естрадіолу у крові значно знижується, хоча у тканині молочної залози цього немає. Локальний рівень естрогенів у тканині молочної залози у жінок зі збереженою менструальною функцією та жінок у менопаузі є однаковим, незважаючи на те, що в крові його концентрація різниться у 10-50 разів [53]. Таке явище можна пояснити або локальним біосинтезом естрогенів, або їх захопленням із циркуляції проти тканинного градієнта. Внесок того чи іншого механізму варіює в пухлинах. Активність STS у пацієток у постменопаузі в 50-200 разів вища, ніж активність ароматази [54]. Це вказує на важливу роль локального естрогеноутворення у розвитку злоякісних новоутворень у жінок у постменопаузі, а також наявність відмінностей гормонально-метаболического статусу та біологічних властивостей пухлини у цієї групи хворих, порівняно з жінками репродуктивного віку.



Активність ароматази може стимулюватися інтерлейкіном-6 і фактором некрозу пухлин  $\alpha$ , а також сполуками, що діють через циклінчний аденозинмонофосфат (цАМФ) простогландин E2 сигнальну систему 1AK-8TAT. Таким чином, одним з важливих критичних факторів, що викликають дисбаланс у системі синтезу та метаболізму естрогенів може бути надмірне утворення E2 при надекспресії ароматази в тканинах-мішенях та/або присутність надмірної активності стероїдсульфатази, яка конвертує запаси E1-сульфату до E1. Імовірно, цей процес важливий у розвитку РМЗ та формуванні злоякісного фенотипу пухлини.

Наукові дані свідчать про те, що нерівноважність в біотрансформації естрогенів, зокрема збільшення утворення катехол-естрогенів, може мати важливий вплив на ризик розвитку РМЗ. Вивчення взаємодій ферментів, таких як катехол-О-метилтрансфераза (КОМТ), із системою метаболізму естрогенів відкриває можливості для розробки цільових стратегій для профілактики та лікування цього типу раку. КОМТ виконує біотрансформацію естрогенів, впливає на утворення катехол-естрогенів, переходячи від естрадіолу до 2-катехолестрадіолу. Такий перехід може мати важливі наслідки для утворення аддуктів, що сприяють генотоксичному ушкодженню ДНК, що може бути одним із механізмів, які сприяють появі ракових патологій.

На даний момент виявлено три варіанти розподілу активності КОМТ у людській популяції, які пов'язані із заміною валіну на метіонін у 158 положенні: висока, середня, низька. Активність ферменту при високо- і низькоактивному варіантах різниться у 4-5 раз [55]. У крові у хворих на РМЗ частіше представлений низькоактивний варіант КОМТ порівняно з високоактивним варіантом, і у даній категорії хворих підвищений ризик розвитку РМЗ, проте ці результати не узгоджуються з даними інших дослідників. Генотип КОМТ може визначити частину індивідуальної сприйнятливості до раку грудей, яка пов'язана з репродуктивними подіями та впливом гормонів. Рівень активності даного ферменту пухлини визначається різними механізмами.

Естроген-2/4-гідроксистероїд-дегідрогеназа регулює баланс між 2- та 4-гідроксиестріонами. Відомо, що переважання 4-гідроксиестріонів асоціюється із збільшеним ризиком розвитку РМЗ порівняно з 2-гідроксиестріонами.

Розглядаючи значення ферменту 2,4 – естрогенгідроксилази при РМЗ, слід зазначити, що літературні дані з цього питання представлені недостатньо. Є відомості, що 2-гідроксиестрогени знижують активність катехол-О-метилтрансферази і перешкоджають інактивації 4-катехolestрогенів. Показано, що у доброякісних та злоякісних тканинах молочної залози переважає конверсія естрадіолу до 4-гідроксиестрадіолу. Цей факт може бути доказом того, що 4-гідроксиестрадіол може опосередковувати розвиток гормон-індукованих пухлин. При вимірюванні концентрації метаболітів катехolestрогенів в екстрактах клітин раку молочної залози було виявлено відношення  $40\text{NE}_2$  до  $20\text{NE}_2$  як 4/1 [56]. Це говорить про те, що у людей, схильних до естроген-асоційованого раку переважна освіта  $40\text{NE}_2$  в органах може бути результатом збільшення концентрацій канцерогенних метаболітів у відповідних тканинах.

На додаток, фермент  $17\beta\text{-HSD}$  конвертує 4-гідроксиестріон у більш активний 4-гідроксиестрадіол. Цей продукт може взаємодіяти з ДНК, створюючи аддукти та сприяти генетичним мутаціям.

Вважається, що гени глутатіон-S-трансферази, а особливо GST M1, і меншою мірою P1 і T1, залучені в патогенез різних раків і виступають як модифікатори і фактори ризику при різних захворюваннях [57]. Ген TST розташований на довгому плечі хромосоми 1 і синтезує 5 ізоформ ферменту. Для розвитку РМЗ найбільш важлива форма GST M1, яка експресується в печінці та клітинах крові. Для GST M1 існує три алельних варіанти, два з яких кодують білки, з приблизно однаковою ферментативною активністю. Третій – мутантний алель, який через велику делецію взагалі не синтезує білковий продукт. Зазначено, що ізоформи GST різних класів здатні нековалентно пов'язувати гідрофобні ліганди, у тому числі гем, білірубін, стероїди, жовчні кислоти, ряд протипухлинних препаратів та канцерогенів [58].

При вивченні генетичного поліморфізму глутатіон-S-трансфераз на великій вибірці людей деякі автори виявили, що у носіїв низькоактивних генотипів GST M1 або GST T1 у кілька разів збільшено ризик розвитку РМЗ, і цей ризик підвищувався за наявності надлишку маси тіла [59]. Інші автори цей зв'язок заперечували [60–61]. У носіїв мутантного генотипу GST T1 та носіїв низькоактивного генотипу GST P1 спостерігалася тенденція до збільшення ризику розвитку РМЗ у молодшому віці, але не у всіх дослідженнях цей зв'язок був достовірним. Можливо, ці відмінності пов'язані з різницею впливів, що спостерігаються при РМЗ [62–63]. Асоціації поліморфних варіантів GST з підвищеним ризиком РМЗ біологічно можливі, але через неузгодженість досліджень вони не зможні і можуть визначатися, крім генетичної мінливості, рядом екзогенних та ендогенних факторів.

Не менш важливим є фермент цитохром Р450, особливо його ізоформа CYP1B1, яка перетворює естрон у більш активний 4-гідроксиестрон. Цей процес збільшує ймовірність утворення генотоксичних молекул та сприяє патологічному розвитку клітин.

Таким чином, розуміння взаємодій ферментів метаболізму естрогенів є ключем до розкриття молекулярних механізмів, які допомагають раковим клітинам молочної залози уникати нормального регулювання і сприяють їхньому неконтрольованому росту.

#### ***1.4.5. Зв'язок ферментів метаболізму естрогенів з клініко-морфологічними параметрами при раку молочної залози***

Сучасні дані про взаємозв'язок ферментів метаболізму естрогенів з клініко-морфологічними параметрами залишаються фрагментарними та часто суперечливими, але їхнє значення є неоспоримим. Визначення ферментів метаболізму естрогенів (аромази, STS, 17 $\beta$ -HSD, 2-/4-естрогенгідроксилази, GST і КОМТ) у пухлинній тканині молочної залози, ймовірно, може служити прогностичним критерієм для відповіді на обрану терапію або результатів захворювання.

Деякі автори переконані в наявності зв'язку між активністю ароматази та розмірами пухлини, в той час як інші зазначають відсутність такого зв'язку [64-66]. Результати також не є однозначними щодо зв'язку активності ароматази з рецепторним статусом пухлини та менопаузальним статусом жінки [64, 67-68]. Деякі дослідження не виявили кореляційної залежності між активністю ароматази в тканинах карциноми молочної залози та залученням у процес метастазування у регіонарні лімфовузли, швидкістю проліферації, клінічною стадією на момент мастектомії, гістологічним типом пухлини та менопаузальним статусом жінки [64, 69]. У пошуку зв'язку між активністю ароматази в пухлині та загальним і безрецидивним виживанням хворих не було знайдено закономірності, хоча інші дослідження свідчать про обережність при висновках [65-66].

Було встановлено достовірну зворотну кореляцію між експресією ізоформи ферменту GST та статусом рецепторів, хоча в іншому дослідженні не зафіксовано такого зв'язку [70-71]. Відсутність кореляції між сумарною активністю TST у пухлині та розміром пухлини, залученістю до процесу регіонарних лімфовузлів, статусом рецепторів естрогенів та прогестерону також фіксується. Є дані щодо залежності активності TST від мітотичного індексу пухлин молочної залози, де зниження активності цього ферменту спостерігалось у хворих з максимальним мітотичним індексом. Генотип КОМТ був пов'язаний із клінічною стадією та ступенем метастазування у регіонарні лімфатичні вузли при раку молочної залози, що свідчить про можливий вплив на пухлинний процес через ослаблену інактивацію катехолестрогену [72].

Попередні дослідження впливу STS та  $17\beta$ -HSD на РМЗ виявили, що вони впливають на прогноз через альтернативне надходження естрогену в тканину молочної залози [73]. На основі цього протягом останніх трьох десятиліть розробляються різноманітні інгібітори STS.

Таким чином, суперечливість в літературних даних підкреслює, що надекспресія ферментів метаболізму естрогенів сама по собі не завжди сприяє росту пухлини, а вивчення взаємозв'язку вищезазначених ферментів з клініко-морфологічними параметрами повинно враховувати інші фактори, що взаємодіють

у метаболізмі естрогенів. Проведене дослідження має на меті розширити наше розуміння механізмів прогресії пухлин, які вмикаються на різних етапах метаболізму естрогенів. Враховуючи комплексні взаємодії ферментів та їхній вплив на характеристики пухлин, дане дослідження може виступити ключовим етапом в удосконаленні персоналізованої терапії та стратегій боротьби з розвитком РМЗ.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Дизайн дослідження

Дослідження проводили на базі відділення загальної онкології Запорізького обласного клінічного онкологічного диспансеру.

За висновком комісії з питань біоетики ДЗ “Запорізької медичної академії післядипломної освіти МОЗ України” дослідження проведене з дотриманням сучасних етичних норм та стандартів. Усі хворі дали згоду на проведення дослідження.

Критеріями включення в групи дослідження були:

- I–IV стадія захворювання;
- вік понад 18 років;
- стан після хірургічного лікування;
- морфологічно верифікований діагноз.

Критерії виключення пацієнток з дослідження:

- вік до 18 років;
- неoad’ювантна хіміотерапія.

Проведено дослідження на операційному матеріалі 85 пацієнток з РМЗ зі стадією T1-4N0-3M0, які впродовж 2017-2022 рр. перебували на стаціонарному лікуванні в Запорізькому обласному клінічному онкологічному диспансері.

Аналізуючи вікові особливості жінок, які звернулися з метою діагностики та лікування, встановлено, що середній вік пацієнток становив  $53,2 \pm 1,8$  років, від 30 до 69 років. Найчастіше РМЗ був прерогативою жінок старше 50 років. У цій групі хворих відзначено 52 випадки (61,2 %). У віці 41-50 років РМЗ діагностовано 26 випадків (30,6 %). До 40 років перебували 7 (8,2 %) хворих (рис. 2.1.1).

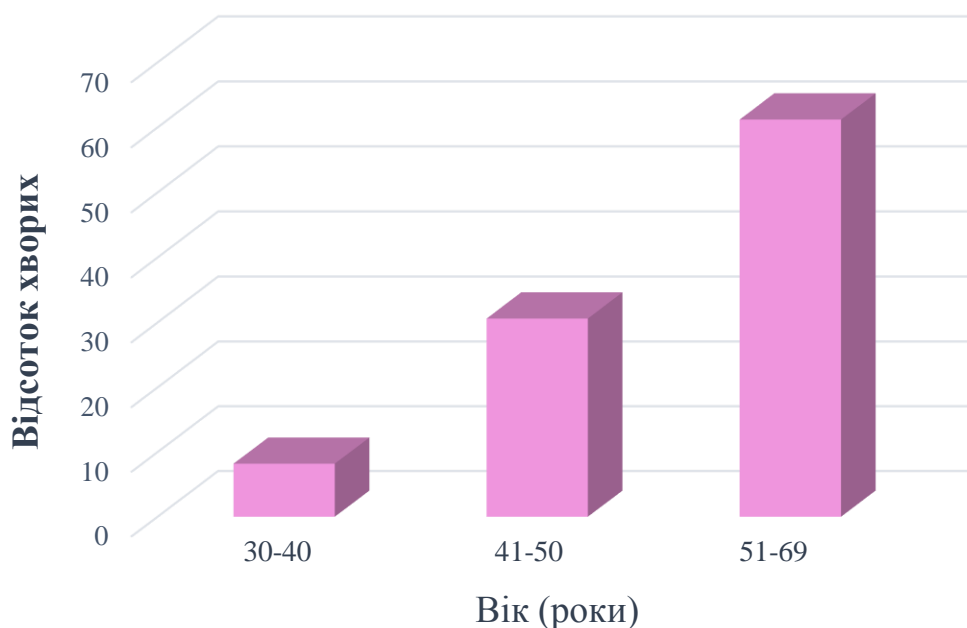


Рисунок 2.1.1. Вікові особливості первинно діагностованого раку молочної залози

За станом менструальної функції учасниць дослідження було поділено на три групи: (i) жінки репродуктивного віку із збереженою менструальною функцією (n=30); (ii) пацієнтки в перименопаузі, у яких менструація відсутня протягом двох років (n=12); (iii) хворі у постменопаузальному періоді (n=43). Виявлено, що більшість хворих перебувають у стані постменопаузи, їх частка становила 50,6 % (табл. 2.1.1).

Таблиця 2.1.1

#### Розподіл хворих на РМЗ залежно від стану менструальної функції

| Стан менструальної функції | Кількість хворих (n) | Кількість хворих (%) |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| Репродуктивний період      | 30                   | 35,3                 |
| Перименопауза              | 12                   | 14,1                 |
| Постменопауза              | 43                   | 50,6                 |

Виявлено, що раннє звернення при РМЗ, незважаючи на доступність діагностики, становило менше 10% клінічних випадків – стадію I встановлено всього у 8 хворих. За критерієм класифікації TNM (табл. 2.1.2), найбільше пацієнток при первинному зверненні мали стадію T2 – 58 % хворих. У цій групі

пацієнок первинна пухлина сягала розмірів 2-5 см. Більше третини хворих (34%) при первинному зверненні були зі стадіями T3 і T4.

Окрім того, особливістю первинних звернень було те, що 37% хворих надходили без ознак метастазування (табл. 2.1.2). У 63% пацієнок були метастази в регіонарні лімфатичні вузли, з них у 35% було виявлено від 1 до 4 метастатично змінених регіонарних лімфовузлів, у 26% хворих було уражено від 5 до 10 лімфовузлів, і в 2% випадків метастази було виявлено більш ніж у 10 лімфовузлах.

*Таблиця 2.1.2*

**Стадіювання хворих за критерієм TNM при первинному зверненні**

| Критерій | Кількість хворих |    |
|----------|------------------|----|
|          | n                | %  |
| T1       | 8                | 9  |
| T2       | 49               | 58 |
| T3       | 18               | 21 |
| T4       | 10               | 12 |
| N0       | 31               | 37 |
| N1       | 30               | 35 |
| N2       | 22               | 26 |
| N3       | 2                | 2  |

Пухлини класифікували за різними ступенями диференціювання згідно з рекомендаціями з рекомендаціями С.W. Elston та I.O. Ellis, які враховують ступінь ядерного поліморфізму та кількість мітозів, що дають змогу ділити пухлини на три групи: G1 – високодиференційовані пухлини з низьким ступенем злоякісності, G2 – помірнодиференційовані пухлини з помірним ступенем злоякісності та G3 – низькодиференційовані пухлини з високим ступенем злоякісності [74]. Виявлено нерівномірний розподіл за ступенем диференціювання між пухлинами високого і помірного рівнів злоякісності пухлини РМЗ. Так, згідно системи гістологічної класифікації помірний рівень злоякісності (G2) первинної пухлини спостерігався у



67% пацієток. У двічі менше хворих (28 проти 57) спостерігався високий градус (G3) пухлини (табл. 2.1.3).

Варто відмітити, що пухлин з низьким рівнем злоякісності виявлено не було.

*Таблиця 2.1.3*

**Розподіл хворих на рак молочної залози залежно від ступеня злоякісності пухлини**

| Ступінь злоякісності пухлини | Кількість хворих (n) | Кількість хворих (%) |
|------------------------------|----------------------|----------------------|
| G2                           | 57                   | 67                   |
| G3                           | 28                   | 33                   |

Аналіз гістологічного типу пухлин (рис. 2.1.2) показав, що при первинному зверненні переважав протоковий інфільтруючий рак – 79,0 % (n=67). Найрідше зустрічався часточковий інфільтруючий РМЗ – у 6,0 % (n=5) хворих та у 15% випадків (n=13) були інші форми РМЗ (рис. 2.1.2).

З метою подальшого складання індивідуального плану лікування, хворим на РМЗ було проведено визначення підтипу раку. Як видно з табл. 2.4, серед усіх гістологічних форм пухлин найчастіше зустрічався люмінальний-А підтип, що становив майже 59% випадків від загальної кількості хворих, а підтипи з несприятливими факторами прогнозу, такі як HER /2neu-позитивний і ТНРМЗ – у 10,6 % та 16,5 % випадків, відповідно.

Найкращий розподіл хворих за гістологічними підтипами видно (табл. 2.1.4) серед пацієток з протоково інфільтруючим РМЗ, оскільки ця група містила найбільшу кількість пацієток (n=67). Як було сказано вище, люмінальний-А підтип зустрічався найчастіше, і у цій групі пацієток становив 61,2% випадків. Практично з однаковою частотою зустрічалися люмінальний-В (майже 12%) та HER/2neu-позитивний (майже 11%) підтипи даної гістологічної форми пухлини. Дещо частіше, у 16% випадків, відмічено базально-подібну форму РМЗ.

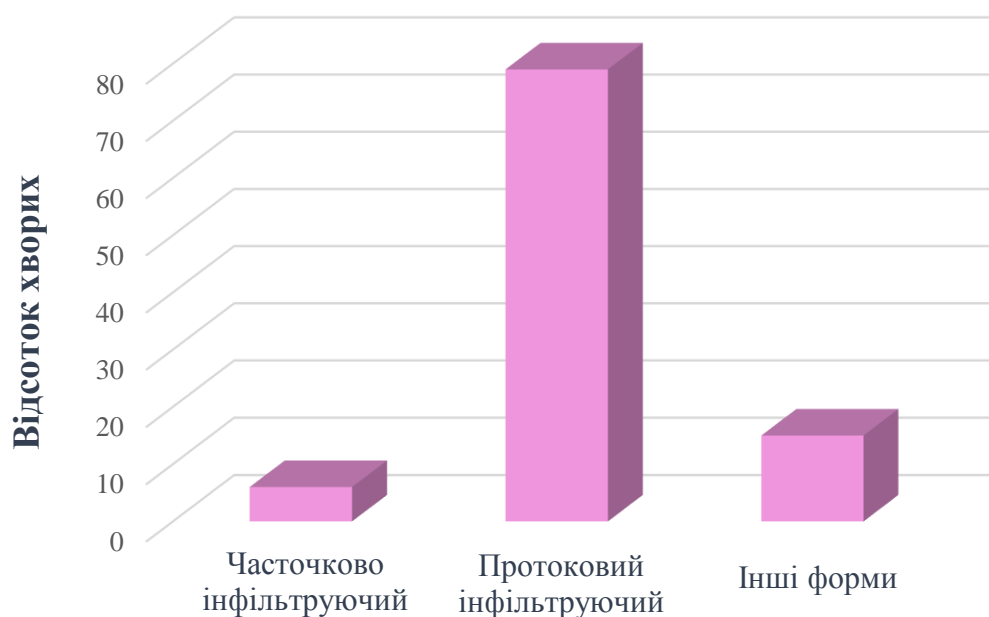


Рисунок 2.1.2. Розподіл хворих на рак молочної залози за морфологічними особливостями пухлин

У 5 хворих спостерігали часточково-інфільтруючий РМЗ. Розподіл підтипів був однаковий, за виключенням люмінального-А, частота випадків якого в цій групі хворих на РМЗ становила рівно 40%.

Таблиця 2.1.4

**Розподіл хворих на рак молочної залози за гістологічними підтипами**

| Підтипи пухлини     | Кількість хворих (%)      |                          |            |
|---------------------|---------------------------|--------------------------|------------|
|                     | Часточковий інфільтруючий | Протоковий інфільтруючий | Інші форми |
| Люмінальний-А       | 40,0                      | 61,20                    | 53,8       |
| Люмінальний-В       | 20,0                      | 11,94                    | 23,1       |
| HER/2neu-позитивний | 20,0                      | 10,45                    | 7,7        |
| ТНPMЗ               | 20,0                      | 16,41                    | 15,4       |
| Всього              | 100                       | 100                      | 100        |

У 13 жінок зустрічалися інші форми РМЗ. Крім люмінальний-А підтипу, який займав найбільшу частку (53,8%), доволі часто зустрічався люмінальний-В підтип пухлини. Найрідше у цій групі спостерігали HER/2neu-позитивний (7,7%) і базально-подібний (13,33%) підтипи РМЗ (табл. 2.1.4).

Основним напрямом лікування хворих було проведення оперативного втручання в залежності від первинної пухлини та локо-регіонарного поширення (табл. 2.1.5).

Таблиця 2.1.5

### Розподіл хворих за методом хірургічного лікування

| Метод хірургічного лікування | Розподіл хворих |      |
|------------------------------|-----------------|------|
|                              | n               | %    |
| РЕМ за Madden                | 28              | 33,0 |
| РЕМ за Patey                 | 24              | 28,2 |
| РЕМ за Halsted               | 1               | 1,1  |
| Р/резекції                   | 16              | 18,8 |
| Ампутації з л/е              | 13              | 15,3 |
| Реконструкції РЕМ            | 3               | 3,6  |

Як видно з табл. 2.1.5, переважним оперативним втручанням була мастектомія за Madden у 28 (33,0%) випадках, за Patey&Dyson – 24 (28,2%), за Halsted – 1 (1,1%), ампутація молочної залози з пахвовою лімфаденектомією – 13 (15,3%), органозберігаючі операції – 16 (18,8%) та реконструктивні – 3 (3,6%) випадки. Реконструкція молочних залоз виконувалася одномоментно із застосуванням силіконових імплантів. Модифікація радикальної мастектомії за Madden передбачає збереження обох грудних м'язів і видалення клітковини I і II рівнів. Перевагою операції є повне видалення клітковини і збереження м'язів і їх іннервації.

У післяопераційному періоді хворим проводили курси поліхіміотерапії (ПХТ). Для призначення ад'ювантного лікування враховували додаткові фактори прогнозу пухлини (CD-34, С/П), і при агресивних пухлинах перевагу віддавали тривалим

курсам ПХТ (1-8 дні, 14 днів) і збільшували їх кількість з 4-х до 6-ти. З огляду на токсичність курсів ПХТ, пацієнтки отримували інтерферонотерапію (лаферон, альфарекін) й імуномодуючу терапію (тіотризолін).

Виконуючи стандарти лікування онкологічних хворих від 2007 р., за показаннями проводили променеви терапію в режимах середнього фракціонування на молочну залозу за три дні 21 Гр і на пахвову ділянку – 18 Гр.

Наступним завданням роботи було проаналізувати віддалені результати після лікування РМЗ за показниками частоти рецидивів та випадків появи метастазів у віддалені органи.

Термін спостереження за хворими, включеними у дослідження, становив від 3 до 61 місяців.

Вивчаючи віддалені результати РМЗ, було виявлено, що прогресування процесу через розвиток рецидивів пухлини відзначено у майже 12% (n=10) хворих та у 22,4% (n=19) пацієнток було виявлено віддалені метастази (табл. 2.1.6).

Варто відмітити, що за весь час спостереження у 56 пацієнток не було зафіксовано рецидиву.

*Таблиця 2.1.6*

**Розподіл хворих за прогресуванням раку молочної залози з часом**

| Терміни спостереження, міс | Випадки рецидивування |      | Випадки віддалених метастазів |      |
|----------------------------|-----------------------|------|-------------------------------|------|
|                            | n                     | %    | n                             | %    |
| 0 - 6                      | 2                     | 2,4  | 6                             | 7,1  |
| 7-12                       | 4                     | 4,7  | 3                             | 3,5  |
| 13-18                      | 2                     | 2,4  | 6                             | 7,1  |
| 19-24                      | 1                     | 1,2  | 3                             | 3,5  |
| 25-30                      | 1                     | 1,2  | 1                             | 1,2  |
| 31-37                      | 0                     | 0,0  | 0                             | 0,0  |
| 38-43                      | 10                    | 11,9 | 19                            | 22,4 |

Було досліджено клінічні особливості хворих на РМЗ, фактори прогресування та ефективність різних методів лікування хворих, які отримали лікування у Запорізькому обласному клінічному онкологічному диспансері. У 29 пацієток, які отримали лікування, був відмічений рецидив захворювання, з них у 19 виникли метастази у віддалені органи та у 10 розвинувся рецидив пухлини. Зразки пухлинної тканини молочної залози та незміненої тканини молочної залози, що знаходиться на відстані 1-5 см від первинної пухлини, метастатично змінені і незмінені регіонарні лімфовузли цих пацієток, а також 56 пацієток, у яких за весь час спостереження не було зафіксовано рецидиву, були очищені від ділянок некрозу і крові та поміщені у пластикові епендорфи, заморожували та зберігали при  $-60^{\circ}\text{C}$  для подальшого дослідження активності ферментів естрогену (АФЕ) та його рецепторів (рис. 2.1.3).

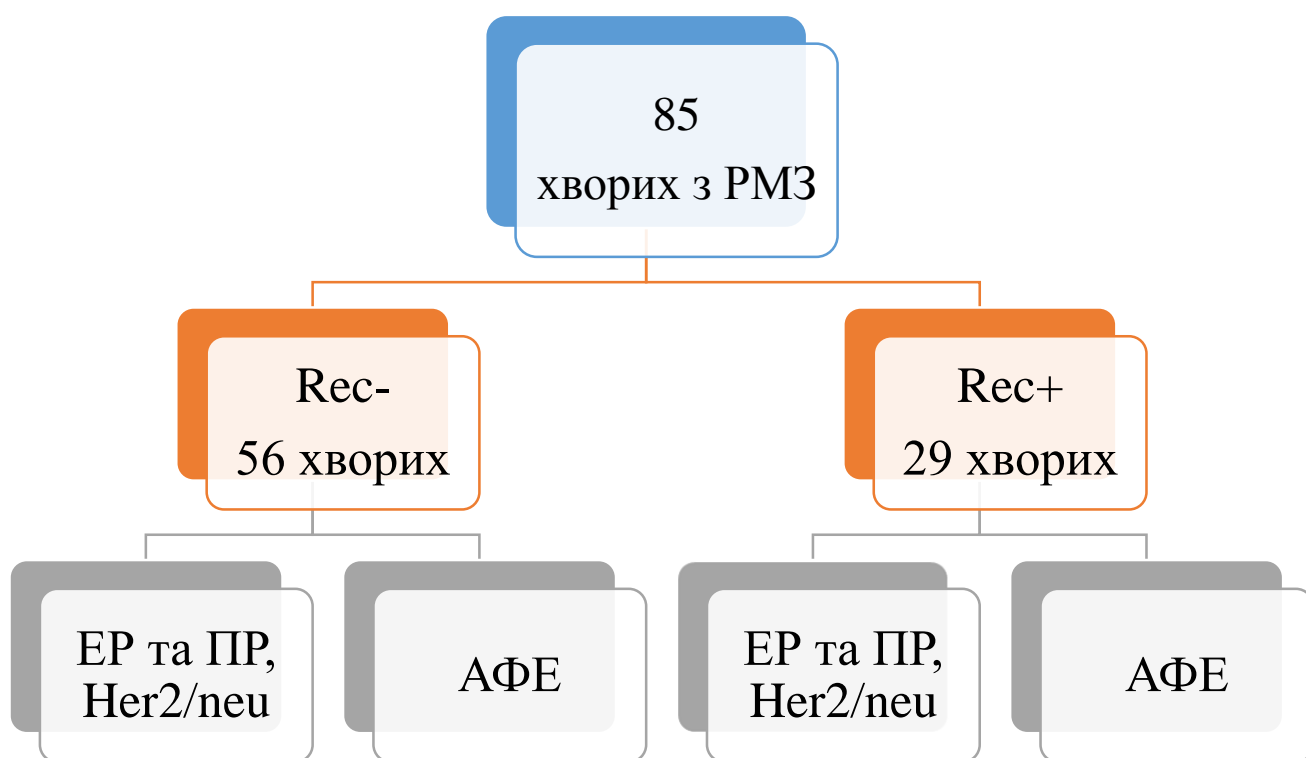


Рисунок 2.1.3. Дизайн дослідження

Усі параметри, що вивчали, були внесені до статистичної бази даних зі збереженням принципу конфіденційності персональних даних пацієток. Верифікацію діагнозу, стадії захворювання, морфологічної та гістологічної

характеристики проводили згідно з рекомендаціями Європейського товариства медичної онкології 2017 року.

## **2.2. Методи обстеження хворих, залучених до дослідження**

Для встановлення діагнозу раку молочної залози та визначення поширеності процесу використовувалися наступні методи:

- *Збір анамнезу*: наявність РМЗ у сімейному анамнезі, характер менструальної функції, кількість пологів та абортів, тривалість лактації, використання гормональних препаратів (контрацептиви, замісна гормональна терапія), наявність гінекологічних захворювань, захворювань щитовидної залози, нервової та травної систем
- *Ультразвукове дослідження (УЗД)*: для встановлення діагнозу та визначення розмірів первинної пухлини здійснювали на апараті ALOKA SSD 5500 (Hitachi Aloka Medical Ltd., Японія). Дослідження проводили до початку лікування та після 2 і 4 курсів хіміотерапії у пацієнок з T1-2N1M0. Для уточнення розмірів пухлини та діагнозу раку використовувалася також мамографія на апараті Маммо-МТ Альфа (МТЛ, Росія) з ручним і автоматичним управлінням.
- *Рентгенографія грудної клітки*: виконувалась на рентгенапараті Digital Philips Diagnost-56 (Philips, Японія). Для виявлення метастазів у віддалені органи та тканини використовували спіральний 16-зрізовий комп'ютерний томограф Aquilion 16 TOSHIBA (TOSHIBA, Японія). Обстеження проводилося за стандартними методиками до початку лікування та після кожного 2 курсу хіміотерапії, і подальше контрольне дослідження проводилося кожні 6 місяців.
- *Радіоізотопне сканування кісток (сцинтиграфія)*: використовувалося для виявлення кісткових метастазів до початку та після закінчення лікування. Для цього використовувався радіоактивний препарат ТЕХНОФОР в середній дозі 700 МБК. Після введення препарату через три години проводилася серія знімків на апараті Siemens ZDC-7500 (Siemens, Японія).

- *Цитологічне дослідження:* здійснювалося у доопераційному періоді. Матеріал для цитологічного дослідження (первинні пухлини і аксилярні лімфатичні вузли розміром більше 1 см в діаметрі) отримували за допомогою пункційної тонкоголкової біопсії. Утворення молочної залози, що не пальпується, пунктують під УЗД за допомогою спеціальної насадки для голки.
- *Гістологічне дослідження.* З метою отримання матеріалу для гістологічного дослідження перед операцією використовувалася трепанобіопсія, застосовуючи спеціальний пістолет фірми PRO MAG 2,2 (Manan Medical Products, Inc (Angiotech) Канада). Інтраопераційне термінове гістологічне дослідження первинних пухлин, анатомічне препарування видаленого матеріалу та планове гістологічне дослідження первинних пухлин і регіонарних лімфатичних вузлів здійснювалися на установці Гістос-5 (Milestone Medical Technologies, США).

Цитологічне і (або) гістологічне дослідження пухлин і метастазів проводилося за стандартними методиками, використовуючи світловий мікроскоп Мікмед-2 (ЛОМО, Росія) та Axio.Scope-A1 (Zeiss, Німечина).

Ступінь злоякісності пухлини визначалася за кількома ознаками:

1. Кількість тубулярних структур (більше 75% – 1 бал, 10-75% – 2 бали, менше 10% – 3 бали);
2. Поліморфізм і гіперхроматоз ядер – 1-3 бали;
3. Кількість фігур мітозу в полях зору  $\times 400$  (1 бал –  $< 5$ ; 2 бали – 5-10; 3 бали –  $> 10$ -12 фігур мітозу в 10 полях зору).

У сумі ознак визначалася ступінь злоякісності: I ступінь – сума балів 3-5, II ступінь – сума балів 6-7, III ступінь – сума балів 8-9.

Перитуморальна інвазія визначалася на світловому мікроскопі за ділянками проростання пухлини через стінку судини в його створі. В сумнівних випадках застосовувався імуногістохімічний метод із забарвленням на ендотелій (CD-34, Class II, клон QVEnd 10). Враховувалася кількість уражених судин в 5-ти полях зору (об'єктив  $\times 200$ , окуляр  $\times 10$ ), і щільність мікросудин (кількість мікросудин в одному полі зору).

### 2.3. Визначення рецепторного статусу пухлини

Велика частина даних базується на дослідженні ER I PR біохімічним методом, який не дозволяє оцінити рецептори гормонів тільки у клітинах пухлинах, а визначає наявність рецепторів гормонів у всьому тканинному шматочку, у тому числі стромі і нормальних протоках молочної залози. Тоді як імуногістохімічне (ІГХ) дослідження дозволяє уникнути цього, оскільки досліджується тканинний зріз із візуальним забарвленням структури пухлини та локалізацій експресії молекулярно-біологічних маркерів: ER та PR, Her2/neu [74]. Для дослідження брали зрізи фіксованої у формаліні, залитої в парафін тканини товщиною 4 мкм. Парафінові зрізи готували на мікротомі Leika (Німеччина) та використовували для ІГХ-реакцій. Демаскування антигенів проводили за температури 98°C протягом 30 хв. Для блокування ендогенної пероксидази зрізи протягом 5 хв інкубували з 0,03% перекисом водню. Після промивки зрізи 30 хв інкубували з первинними антитілами: рецептор до естрогену  $\alpha$  (Monoclonal Rabbit Anti-Human, RTU, clone SP1, Dako), рецептор до прогестерону (Monoclonal Mouse Anti-Human, RTU, clone PgR 636, Dako), c-erbB2 (Polyclonal Rabbit Anti-Human, 1:1000, Dako). Після цього 20 хв інкубували з полімером HRP візуалізаційної системи FLEX (Dako). Після чергової промивки наносили на 3 хв DAB і контрастували ядра гематоксилином Майєра.

Для інтерпретації ІГХ реакції з антитілами проти ER та PR застосовували метод H-score. Рівень експресії визначали за формулою:  $H = 3 \times \text{відсоток інтенсивно забарвлених ядер} + 2 \times \text{відсоток помірно забарвлених ядер} + 1 \times \text{відсоток слабо забарвлених ядер}$ .

При значеннях  $H > 100$  рівень експресії маркера вважали високим (3+), 50- 99 – середнім (2+),  $H < 50$  – низьким (1+).

Для інтерпретації реакції з антитілами проти Her2/neu (c-erbB2) застосовували такі критерії: 0 — відсутність забарвлення; 1+ — слабе неповне пофарбування мембрани пухлинних клітин; 2+ – середня інтенсивність пофарбування мембрани більше 10% пухлинних клітин; 3+ – інтенсивне пофарбування мембрани більше



10% пухлинних клітин. Пухлини з рівнем експресії 0 та 1+ вважали Her2/neu-негативними, а з 2+ та 3+ – позитивними.

Для перевірки базально-клітинного походження в пухлинах з тричі рецептор-негативним (тричі негативним) фенотипом (ER-/PR-/Her2/neu-) визначали експресію цитокератину 5/6 (СК 5/6). За наявності позитивної цитоплазматичної реакції в більше ніж 10% пухлинних клітин пухлину вважали тричі негативною базальною, в іншому випадку – тричі негативною небазальною.

## **2.4. Визначення активності ферментів метаболізму естрогену**

### **2.4.1. Визначення активності ароматази**

Оцінку активності ароматази здійснювали за утворенням важкої води з міченого тритієм в 1- $\beta$ -положенні андростендіону. Зразки тканини молочної залози (80 мг) гомогенізували в рідкому азоті до отримання порошку, який екстрагували 5-кратним об'ємом калій-фосфатного буфера з 1 мМ ЕДТА (рН=7,5; 12,5 мМ). Гомогенат центрифугували протягом 15 хвилин при 3000 об/хв за 4°C. 200 мкл надосадової рідини використовували для визначення активності ароматази радіометричним методом, інкубуючи з [1 $\beta$ -H]-андростендіоном [75].

Використаний у методиці [1 $\beta$ -H]-андростендіон із молярною радіоактивністю не менше 30 Сі/ммоль був синтезований в лабораторії ізотопного обміну Інституту молекулярної біології та генетики Національної академії наук України (м. Київ). До складу інкубаційної суміші (500 мкл) входили: 12,5 мМ калій-фосфатний буфер з 1 мМ ЕДТА (рН=7,5), 5 мМ 1,4-дитіотрейтолу (ДТТ), 0,5 мМ НАДФН, 10 мкл на пробу [1 $\beta$ -H]-андростендіону. НАДФ вносили в інкубаційну суміш рівними частками кожні 30 хв протягом усього періоду інкубації. Суміш інкубували 2 години при 37°C. Реакцію зупиняли додаванням 5 обсягів попередньо очищеного та охолодженого хлороформу.

Потім протягом 30 секунд суміш енергійно струшували і центрифугували впродовж 10 хв при 1500 об/хв при 4°C. Водну фазу змішували з рівним об'ємом 5% суспензії активованого вугілля Norit А та енергійно струшували. Після осадження вугілля центрифугуванням надосадову рідину по 200 мкл розливали у

дві віали з 4 мл сцинтиляційної рідини (Eco Lume, ICN, США). Рахунок радіоактивності виробляли на тритієвому каналі сцинтиляційного рідинного лічильника MICROBETA (Perkin Elmer, США). Результат розраховували, виходячи із середнього рахунку у двох віалах. Білок визначали за методом Лоурі. Активність ферменту виражали у фмоль андростендіону/мг білка на 1 год.

#### ***2.4.2. Визначення вмісту білка за методом Лоурі***

Вміст білка у досліджуваних тканинах визначали за допомогою методу Лоурі [76]. Згідно з цим методом, білок у пробі утворює стійке яскраво-жовте забарвлення під дією реактиву Фоліна, що має максимальне поглинання світла при довжині хвилі 600 нм. У нашому дослідженні для визначення вмісту білка було взято по 70 мкл цитозолу. Інкубаційна суміш містила 330 мкл реактиву 1 (складається з 2% розчину  $C_{11}SO_4$ , 1% розчину калій бітартрату та розчину соди у співвідношенні 1:1:100 відповідно); 33 мкл реактиву 2 (суміш реактиву Фоліна та дистильованої води у співвідношенні 1:1); 430 мкл дистильованої води. Суміш інкубувалась протягом 30 хвилин при кімнатній температурі для утворення забарвлення. Після цього проводився спектрофотометричний вимір при  $\lambda = 750$  нм. Кількість білка розраховувалася за стандартною калібрувальною кривою, використовуючи бичачий сироватковий альбумін (Sigma, США) як стандарт.

#### ***2.4.3. Визначення активності стероїд сульфатази***

Очищене за допомогою методу афінної хроматографії моноклональне антитіло STS (KM1049) використовувалося для ІГХ аналізу за методикою, описаною в [77]. Для ідентифікації STS використовували набір Histofine Kit (Nichirei, Токіо, Японія), який використовує метод ампліфікації стрептавідин-біотин. Для імунного фарбування виявлення антигену не проводилося. Розведення первинних антитіл, використаних у цьому дослідженні, були такими 1/9000 STS (0,37 мкг/мл). Комплекс антиген-антитіло візуалізували за допомогою розчину 3,3'-діамінобензидину [1 мМ 3,3'-діамінобензидину, 50 мМ Трис-НСІ буфера (рН 7,6) і 0,006%  $H_2O_2$ ] і контрастно фарбували гематоксиліном. Як позитивний контроль використовували людську тканину плаценти. Як негативний контроль замість

первинних антитіл використовували нормальний кролячий або мишачий IgG. У цих зрізах не виявлено специфічної імунореактивності.

Усі імунномічені клітини були оцінені як позитивні, незалежно від імунної інтенсивності. Для статистичного аналізу імунореактивності STS визначили відсоток позитивних клітин у кожній карциномі згідно з дослідженням [69]. Після повного перегляду імунофарбовані зрізи кожної пухлинної тканини були розподілені на три групи: ++ – більше 50% позитивних клітин; +- 0–50% позитивних клітин; N – відсутність імунореактивності. Надійність і відтворюваність методу була підтверджена включенням перевіреної позитивної контрольної тканини до кожного циклу ІГХ аналізу.

#### ***2.4.4. Визначення активності 17 бета-гідроксистероїд дегідроенази***

Активність 17 $\beta$ -HSD2 визначали методом ІГХ з використанням кролячих поліклональних антитіл Anti-HSD17B10 (Sigma-Aldrich, США). Імуногістохімічний аналіз здійснювали з використанням методу ампліфікації стрептавідин-біотин з використанням набору Histofine (Nichirei, Токіо, Японія) згідно детально описаному методу [77]. Комплекс антиген–антитіло візуалізували за допомогою розчину 3,3'-діамінобензидину (DAB) (1 мМ DAB, 50 мМ трис-НСІ буфера (рН 7,6) і 0,006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) і контрастно фарбували метиловим зеленим. Як негативний контроль замість первинних антитіл використовували нормальний кролячий або мишачий IgG. У цих зрізах не виявлено специфічної імунореактивності.

Усі імунномічені клітини були оцінені як позитивні, незалежно від імунної інтенсивності. Для статистичного аналізу імунореактивності 17 $\beta$ -HSD визначили відсоток позитивних клітин у кожній карциномі згідно з дослідженням [69]. Після повного перегляду імунофарбовані зрізи кожної пухлинної тканини були розподілені на три групи: ++ – більше 50% позитивних клітин; + – 0–50% позитивних клітин; N – відсутність імунореактивності. Надійність і відтворюваність методу була підтверджена включенням перевіреної позитивної контрольної тканини до кожного циклу ІГХ аналізу.

## 2.5. Статистична обробка результатів

Для статистичного аналізу отриманих результатів використовували пакет програм обробки даних загального призначення Statisticafor Windows версії 7.0 (StatSoftinc., США) та SPSS 17.0.

Достовірність розбіжності визначали за допомогою F-критерію Фішера для параметричних даних. Достовірність різниці між групами визначали за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні для незалежних вибірок. Наявність зв'язку між ознаками оцінювали з використанням кореляційного аналізу за коефіцієнтом кореляції Спірмена. Для аналізу взаємозв'язку між активністю ароматази та ступенем агресивності пухлини був використаний регресійний аналіз. Для оцінки прогностичної значущості статусу рецепторів стероїдних гормонів та активності ферментів метаболізму естрогенів у тканинах при РМЗ використовували однофакторний аналіз прогностичної значущості ознак з використанням критерію Гехана-Вілкоксона за допомогою пакету програм Statistica 6.0. Статистично значущими вважалися відмінності при  $p < 0,05$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

#### 3.1. Дослідження експресії рецепторів стероїдних гормонів та HER2/neu у пухлинній тканині жінок з раком молочної залози

При класифікації РМЗ на молекулярно-генетичні підгрупи, було враховано експресію рецепторів до естрогену, прогестерону та епідермального фактору росту. Реакція вважалася стероїд-позитивною лише за умови виявлення позитивно забарвлених ядер, іноді з супутньою позитивною цитоплазматичною реакцією у пухлинних клітинах. Проте цю реакцію виключали і розглядали як псевдопозитивну, оскільки вона могла виникати через можливу взаємодію хромогену з цитоплазматичним компонентом клітин. Дослідження виявили, що реакція є варіативною у кожному конкретному випадку, залежно від кількості та інтенсивності забарвлення рецептор-позитивних клітин. З урахуванням цього, рецепторний статус тканини був оцінений як негативний, слабопозитивний, помірнопозитивний або сильнопозитивний.

При визначенні показників експресії ER у тканині РМЗ у одній і тій же пухлинній тканині іноді спостерігали неоднорідність реакції на експресію рецепторів: відмічали присутність як рецептор-позитивної, так і рецептор-негативної тканини (табл. 3.1.1), що говорить про нестабільність рецепторного фенотипу пухлинних клітин. Така лабільність рецепторного фенотипу може впливати на якісні та кількісні характеристики мікрооточення пухлини, а також на заплановане лікування.

Таким чином, ER-позитивний статус загалом мали 62 учасниці, з них слабопозитивну реакцію спостерігали у 18 випадків, помірнопозитивну – у 22 випадків та сильнопозитивну – у 22 зразках РМЗ (табл.3.1.1).

У випадку відсутності експресії ER, присутність PR не виявляли. При цьому експресію PR було виявлено у 82% (n=51) випадків серед ER-позитивних пухлин (табл. 3.1). Ця закономірність вказує на залежність наявності PR від чутливості

клітин РМЗ до естрадіолу. Як і у випадку дослідження експресії ER, реакція вважалась позитивною при забарвленні більше 1% клітин будь-якого ступеня інтенсивності. Так, негативна реакція була присутня у 34 випадках, слабопозитивна – у 28 випадках, помірнопозитивна – 16 зразках та сильнопозитивна реакція – у 7 випадках РМЗ (табл. 3.1.1).

Таблиця 3.1.1

### Експресія ER та PR у пухлинній тканині хворих на рак молочної залози

| Рецепторний статус | ER                     |   | PR                     |   |
|--------------------|------------------------|---|------------------------|---|
|                    | Кількість випадків (n) | Відсоток від загальної кількості хворих | Кількість випадків (n) | Відсоток від загальної кількості хворих |
| Негативний         | 23                     | 27                                      | 34                     | 40,0                                    |
| Слабопозитивний    | 18                     | 21,2                                    | 28                     | 32,9                                    |
| Помірнопозитивний  | 22                     | 25,9                                    | 16                     | 18,9                                    |
| Сильнопозитивний   | 22                     | 25,9                                    | 7                      | 8,2                                     |

Аналіз отриманих даних виявив високу пряму кореляцію ( $r = 0,81$ ) між експресією рецепторів до естрогену та прогестерону у пухлинах молочної залози, що підтверджує важливість впливу гормонального фону на розвиток РМЗ.

Додатковий аспект нашого дослідження охопив вивчення взаємозв'язку між різними клініко-патологічними змінними та гормональним статусом пухлин РМЗ (табл. 3.1.2). Не зважаючи на тенденцію до підвищення рівня експресії ER у пухлинах РМЗ у жінок після 50 років, статистично достовірної залежності між віком та рівнями експресії гормонів виявлено не було.

Результати дослідження встановили негативну кореляцію ( $r = -0,71$ ) між експресією PR та рівнем злоякісності пухлини та помірну негативну кореляцію між експресією ER та її G-статусом (табл. 3.1.2). Отримані дані підтверджують попередні відомості про те, що із прогресуванням злоякісного процесу спостерігається зниження стероїд-рецепторного статусу клітин.

У ході дослідження визначено, що більшість пухлин віднесено до категорії T2, з виразним переважанням ER в пухлинній тканині, що вказує на потенційно благоприятний прогноз у цій групі хворих У цей час у пухлинах категорій T3-T4 експресія ER була розподілена рівномірно, охоплюючи як ER+, так і ER- варіанти (табл. 3.1.2).

Таблиця 3.1.2

**Асоціативний зв'язок між рецепторами естрогенів та прогестеронів та клініко-патологічними змінними**

| Клініко-патологічні змінні |            | ER+    | ER-   | PR+   | PR-   |
|----------------------------|------------|--------|-------|-------|-------|
|                            |            | n=62   | n=23  | n=51  | n=34  |
| Вік                        | < 50 років | 29,4%  | 9,4%  | 25,9% | 13%   |
|                            | >50 років  | 43,5%  | 17,6% | 34,1% | 27%   |
| G-статус                   | G2         | 41,7 % | 9,4%  | 53%   | 14,1% |
|                            | G3         | 15,2%  | 17,6% | 7,1%  | 25,9% |
| Розмір пухлини             | < 2 см     | 9,4%   | 0,0%  | 7,1%  | 2,35% |
|                            | 2-5 см     | 45,9%  | 11,8% | 42,4% | 15,3% |
|                            | >5 см      | 17,7%  | 15,3% | 13%   | 20%   |
| Метастази у лімфовузлах    | Відсутні   | 21,2%  | 15,3% | 18,8% | 17,5% |
|                            | Присутні   | 51,8%  | 11,8% | 41,2% | 22,4% |
| Рецидив                    | Rec+       | 61,2%  | 4,7%  | 55,3% | 10,6% |
|                            | Rec-       | 11,8%  | 22,3% | 4,7%  | 29,4% |

Примітка: дані наведені у відсотках від загальної кількості хворих

Аналіз експресії вищезазначених рецепторів у лімфатичних вузлах виявив, що у всіх випадках спостерігався стероїдпозитивний профіль пухлинної тканини у метастазі, який збігався із статусом рецепторів у первинному вогнищі (табл. 3.1.2).

Виявлено значущий зворотній кореляційний зв'язок ( $r = -0,74$ ) між випадками рецидиву та експресією ER та PR у пухлині РМЗ. Протягом всього часу спостереження за 85 пацієнтками, у 29 з них відзначено прогресування злякисного процесу через розвиток рецидивів пухлини та віддалених метастазів (табл. 2.6).

Аналіз результатів дослідження показав, що первинна пухлина цих пацієнток відрізнялася в основному відсутністю експресії ER та PR у пухлинній тканині. З іншого боку, більшість пацієнток із гормоночутливими пухлинами не мали рецидивів протягом усього терміну спостереження (табл. 3.1.2).

Під час визначення профілю Her2/neu у пухлинній тканині враховували наявність мембранного забарвлення клітин. Тканину вважали HER2/neu+, якщо більш ніж 10% клітин проявляли виражену мембранну реакцію у вигляді товстої лінії, що утворює повний обідок навколо більшості клітин. Також часто спостерігали сильну дифузну цитоплазматичну реакцію.

Серед хворих на рак жінок, які прийняли участь у дослідженні, Her2/neu позитивний профіль пухлини виявлено у 9 (табл. 3.1.3). При цьому було виявлено помірну від'ємну кореляцію ( $r = -0,55$ ) між наявністю рецепторів до стероїдних гормонів та виявленням HER2/neu рецепторів.

Таблиця 3.1.3

**Розподіл пухлинної тканин раку молочної залози  
на молекулярно-генетичні типи**

| Фенотип пухлини     | Критерії діагнозу         | Кількість випадків | Відсоток від загальної кількості хворих |
|---------------------|---------------------------|--------------------|---|
| Люмінальний-А       | ER+<br>PR+/-<br>HER2/neu  | 50                 | 58,8                                    |
| Люмінальний-В       | ER+<br>PR+/-<br>HER2/neu+ | 12                 | 14,1                                    |
| HER2/neu позитивний | ER-<br>PR-<br>HER2/neu+   | 9                  | 10,6                                    |
| ТНPMЗ               | ER-<br>PR-<br>HER2/neu-   | 14                 | 16,5                                    |

Таким чином, враховуючи вищезазначений розподіл експресії рецепторів всі випадки PMЗ були розподілені за наступними молекулярно-генетичними типами:



Люмінальний-А тип, люмінальний-В тип, HER2/neu позитивний та тричі негативний РМЗ (ТНРМЗ) – (табл. 3.1.3).

### 3.2. Дослідження активності ароматази у пухлинній тканині молочної залози, незмінній тканині молочної залози та регіонарних лімфатичних вузлах

Аналіз отриманих результатів показав, що активність ароматази (АА) спостерігалася у майже 80% досліджуваних зразках тканини молочної залози і варіювала від 2,9 до 119 фмоль андростендіону/мг білка на год (у.о.). При цьому у незмінній тканині молочної залози, яку отримували під час оперативного втручання на відстані 1-5 см від пухлинної тканини, АА спостерігалася із середнім значенням показника 12,3 у.о. В цей час, медіана активності ферменту в тканині пухлини у 4 рази статистично достовірно ( $p < 0,001$ ) перевищувала відповідний показник у зразках незміненої тканини молочної залози (рис. 3.2.1).

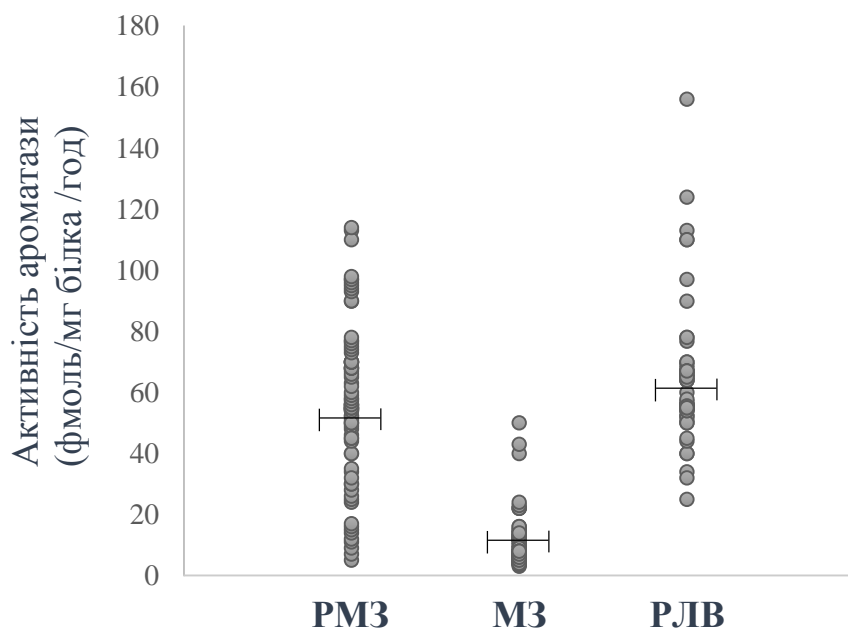


Рисунок 3.2.1. Розподіл активності ароматази у зразках тканини пухлини молочної залози (РМЗ), незмінній тканині молочної залози (МЗ) і регіонарних лімфатичних вузлах (РЛВ), взятих у жінок з РМЗ

На додаток, AA виявлена у 80% зразках лімфатичної тканини, отриманих з метастатично активних регіонарних лімфатичних вузлів 54 жінок. Як видно на рис. 3.1, медіана активності ферменту перевищувала, проте не достовірно, відповідний показник для пухлинної тканини і становила 62,5 у.о.

Аналіз взаємозв'язку між AA та ER у 85 зразках пухлини РМЗ показав, що у різних підгрупах пухлин були всі можливі комбінації обох параметрів. Однак AA-позитивні пухлини у більшій мірі ( $p < 0,05$ ) були позитивними за естрогеновими рецепторами, у той час як ті, що не виявили активності ароматази, були рівномірно розподілені між рецептор-позитивними та рецептор-негативними популяціями (табл. 3.2.1). Ця позитивна асоціація між наявністю естрогенових рецепторів та ароматазою мала статистично значущий характер.

*Таблиця 3.2.1*

**Взаємозв'язок між активністю ароматази та естрогеновими рецепторами у пухлинах раку молочної залози**

| Активність ароматази | ER+  | ER- |
|----------------------|------|-----|
| +                    | 73%* | 13% |
| -                    | 7%   | 7%  |

Примітка: дані наведені у відсотках від загальної кількості хворих;

\* –  $p < 0,05$ , відмінності достовірні між показниками для ER+ пухлин

Виявлено закономірність між активністю ароматази у первинній пухлині та ступенем її агресивності (за G-статусом). Як показано в табл. 3.2.2, пухлини, класифіковані як помірно та високо агресивні були розподілені відповідно до активності досліджуваного ферменту. Видно, що для пухлин з високою агресивністю (G3) характерним було відсутність AA (10,5% випадків) або ж вона становила менше 56 у.о. (42,4% випадків). В той час, переважна більшість первинних пухлин, для яких характерна була помірна злоякісність (G2), мали високу ароматазну активність (20% випадків). Варто відмітити, що у 0,4% пухлин без доказів ароматазної активності мали високу низьку і/або помірну клітинність і,

навпаки, 15,3% випадків раку виявляли високу ароматазну активність, незважаючи на їх високу клітинність.

Таблиця 3.2.2

**Ароматазна активність у пухлинах раку молочної залози залежно від ступеня злоякісності**

| Активність ароматази | Відсоток випадків |      |
|----------------------|-------------------|------|
|                      | G3                | G2   |
| Відсутня             | 10,5%             | 0,4% |
| <56 у.о.             | 42,4%             | 9,4% |
| >56 у.о.             | 15,3%*            | 20%* |

Примітка: дані наведені у відсотках від загальної кількості досліджуваних.

\* –  $p < 0,05$ , статистично достовірна відмінність між показниками однієї групи досліджуваних

При визначенні залежності між АА та розміром первинної пухлини у пацієток з РМЗ достовірної закономірності виявлено не було (табл. 3.2.3). Так, значну активність ароматази у тканині РМЗ зафіксовано у пацієток, розмір пухлини за критерієм TNM у яких визначали як T2. Всього 6% пухлин у цій групі хворих не виявляли активність ферменту. У цей час, атиктивність ферменту як у пухлині T1, так і T3 були практично однаковими і становили відповідно 62% і 58% випадків. Більше того, серед 18 хворих з пухлиною T3, де спостерігалася тенденція до зниження частоти АА у пухлині, статистично достовірних відмінностей з іншими групами знайдено не було (табл. 3.2.2).

У спробі виявити асоціативний зв'язок між активністю ароматази в пухлинній тканині РМЗ та інцидентами метастазування в регіонарні лімфатичні вузли при первинному зверненні пацієток, виявлено, що частіше за все ( $p < 0,05$ ) активність ферменту (АА+) зустрічалася у пацієток з метастазами, ніж без них. Так само, під час аналізу випадків рецидиву хвороби було виявлено, що АА+ переважно присутня ( $p < 0,05$ ) у хворих із прогресуючим перебігом хвороби. Та незважаючи на

достовірність цих показників, регресійний аналіз не виявив достовірної асоціації між зазначеними параметрами (табл. 3.2.4).

Таблиця 3.2.3

**Активність ароматази у пухлинній тканині раку молочної залози в залежності від розміру (за критерієм TNM)**

| Розмір пухлини | Кількість випадків | Статус ароматази |           |
|----------------|--------------------|------------------|-----------|
|                |                    | Активна          | Неактивна |
| T1             | 8                  | 62%              | 38%       |
| T2             | 49                 | 94%              | 6%        |
| T3             | 18                 | 58%              | 42%       |
| T4             | 10                 | 71%              | 29%       |

Таблиця 3.2.4

**Активність ароматази у пухлинній тканині молочної залози в залежності від випадків рецидиву і метастазування в регіонарні лімфатичні вузли**

| Статус АА | Rec+   | Rec-  | <i>r</i> | <i>p</i> | Met+   | Met-  | <i>r</i> | <i>p</i> |
|-----------|--------|-------|----------|----------|--------|-------|----------|----------|
| АА+       | 59,2%* | 6,2%  | 0,04     | >0,05    | 56,7%* | 17,3% | 0,065    | >0,05    |
| АА-       | 10,5%  | 24,1% |          |          | 14,3%  | 11,7% |          |          |

Примітка: дані наведені у відсотках від загальної кількості досліджуваних.

\* –  $p < 0,05$ , статистично достовірна відмінність між показниками

При пошуку асоціативного зв'язку між віком та рівнем АА у тканині молочної залози також не було виявлено достовірної кореляції між досліджуваними показниками (рис. 3.2.2).

Тим не менше, тенденція до підвищення рівня активності ферменту у незмінній тканині молочної залози спостерігається серед пацієток у пери- та постменопаузальному періоді, проте його середні показники статистично досовірно не відрізняються між собою у всіх досліджуваних групах пацієток (рис. 3.2.3).

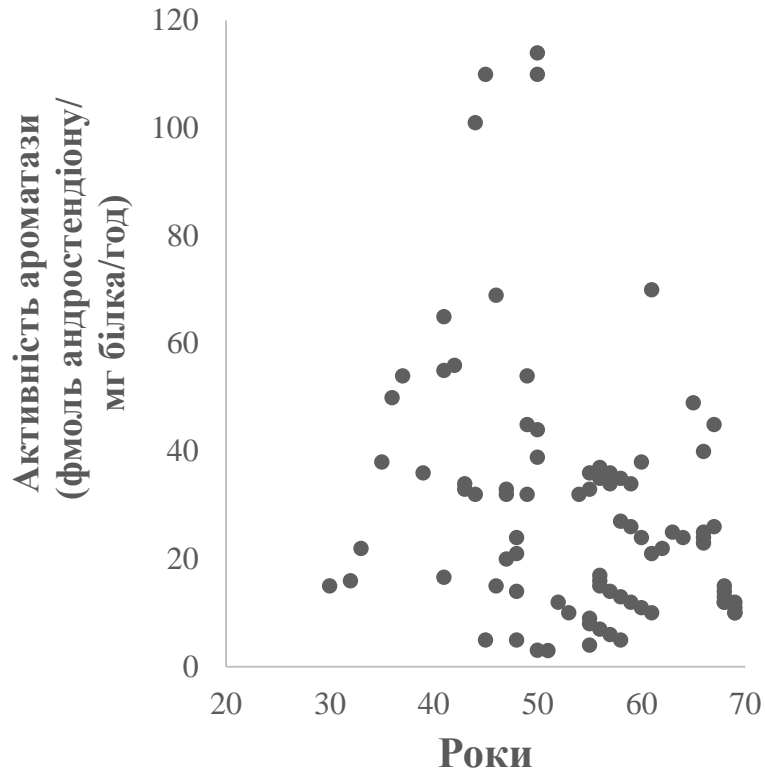


Рисунок 3.2.2. Розподіл активності ароматази у тканині незміненої молочної залози залежно від віку хворих на РМЗ

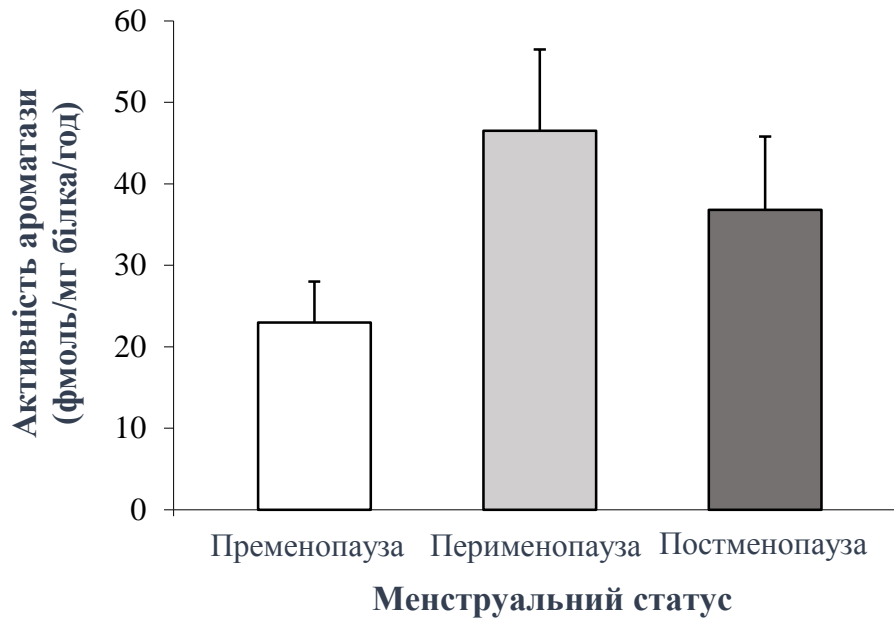


Рисунок 3.2.3. Активність ароматази у незміненій тканині молочної залози у хворих на РМЗ з різним менструальним статусом

### 3.3. Дослідження активності стероїд сульфатази та 17 $\beta$ -гідроксистероїд дегідрогенази у пухлинній тканині молочної залози

Аналіз результатів дослідження STS та 17 $\beta$ HSD2 в пухлинній тканині РМЗ виявив, що більшість випадків були позитивними на активність цих ферментів більш виражено у групі хворих з РМЗ у період пременопаузи (табл. 3.3.1).

Таблиця 3.3.1

#### Активність стероїд сульфатази та 17 $\beta$ -гідроксистероїд дегідрогенази у пухлинній тканині молочної залози жінок в залежності від менструального періоду

| Статус показника<br>(+позитивний/-негативний) | Менструальний статус |              |
|---|----------------------|--------------|
|   | Постменопауза        | Пременопауза |
| STS-  | 43,4%                | 38,6%        |
| STS+  | 56,6%                | 61,4%        |
| 17 $\beta$ HSD-                               | 23,1%                | 13,4%        |
| 17 $\beta$ HSD+                               | 76,9%                | 86,6%        |

Зв'язки між досліджуваними показниками та випадками рецидиву і метастазуванням у регіонарні лімфатичні вузли наведені в таблиці 3.3.2. Як видно з таблиці, маркером, який найбільше пов'язаний з рецидивом або метастазуванням виявився STS. Позитивна експресія STS в пухлині корелювала зі значно нижчою частотою місцевих рецидивів або метастазуванням ( $r=-1,37$ ,  $p < 0,05$ ;  $r = -1,8$ ,  $p < 0,001$ , відповідно). 17 $\beta$ HSD продемонстрував слабший ефект з позитивною експресією, що асоціювалася зі збільшенням частоти рецидивів ( $r=1,4$ ,  $p = 0,03$ ). Тим не менше достовірного значення кореляції для випадків метастазування у регіонарні лімфатичні вузли при первинному зверненні пацієток з РМЗ та 17 $\beta$ HSD виявлено не було.

Таблиця 3.3.2

**Залежність між активністю ферментів естрогену у пухлинній тканині раку молочної залози та випадками рецидиву і метастазування в регіонарні лімфатичні вузли**

| АФЕ             | Rec+  | Rec-  | <i>r</i> | <i>p</i> | Met+  | Met-  | <i>r</i> | <i>p</i> |
|-----------------|-------|-------|----------|----------|-------|-------|----------|----------|
| STS+            | 11,6% | 47,1% | -1,37    | <0,05    | 8,2%  | 50,7% | -1,8     | <0,001   |
| STS-            | 20,3% | 21,0% |          |          | 20,0% | 20,1% |          |          |
| 17 $\beta$ HSD+ | 29,7% | 52,2% | 1,4      | <0,05    | 26,1% | 55,2% | 1,2      | >0,05    |
| 17 $\beta$ HSD- | 2,17% | 15,9% |          |          | 2,2%  | 16,4% |          |          |

**3.4. Прогностичне значення активності ферментів метаболізму естрогенів та рецепторів естрогенів та прогестерону при раку молочної залози в рамках проведеного дослідження**

Отримані результати дослідження доказали, що визначення клініко-патологічних параметрів при РМЗ, як-от оцінка експресії ER та PR у пухлинній тканині й активність деяких ферментів естрогену, є корисним прогностичним інструментом для визначення перспектив розвитку хвороби. Не зважаючи на отримані контрверсійні дані, цей підхід виокремлює ключові молекулярні маркери, які можуть служити важливими показниками для передбачення характеру та перебігу захворювання, що відкриває можливості для персоналізованого лікування та ефективного моніторингу пацієнтів із РМЗ.

Численними дослідженнями відмічено, що визначення експресії ER та PR при РМЗ є корисним прогностичним методом [78]. Пухлини, які проявляють експресію рецепторів ER та PR демонструють високу відповідь на гормональну терапію та хіміотерапію, що веде до поліпшення прогнозу, збільшення виживання та зниження смертності [78–79]. У нашому дослідженні, у якому прийняли участь 85 хворих на РМЗ жінок, кількість гормонопозитивних пухлин була значно вищою, ніж гормонегативних. При цьому виявлено зворотній кореляційний зв'язок між ER і PR статусом пухлини та випадками рецидиву. Більшість авторів

погоджуються, що пацієнти з ER-позитивним РМЗ мають довшу загальну виживаність, ніж хворі з ER-негативними пухлинами [80–82]. Однак в іншій роботі стверджується, що ці дані обмежуються першими 5 роками. Поза цим періодом спостереження, пацієнти із позитивним та негативним статусом рецепторів мають майже однакові ризикові показники [83]. Взаємозв'язок гормонально-рецепторного статусу та проліферативної здатності може залишатися значущим, але когерентність із метастатичним потенціалом залишається відкритим для додаткових досліджень.

Наше дослідження не виявило достовірної залежності між рецепторним статусом у первинних та метастатичних тканинах та метастатичним потенціалом. Тим не менш, спостережена нами стійка кореляція між стероїдпозитивністю первинної пухлини та метастазом може свідчити про можливий спільний патогенетичний механізм у формуванні та подальшому розповсюдженні пухлини. Зокрема, системний вплив гормонального фону може збільшувати чутливість стероїдпозитивних пухлин до змін у гормональному фоні, що в свою чергу сприяє проліферації та інвазивності, стимулюючи утворення та поширення метастазів [84].

З високим рівнем стероїдпозитивності пов'язують можливість посилення сигнальних шляхів, що контролюють метастатичний потенціал, та створення сприятливих умов для поширення пухлинних клітин [85–86]. Також, взаємодія з мікросередовищем може впливати на формування метастазів, можливо, через вплив на ангиогенез чи імунну відповідь [87].

Ці патогенетичні зв'язки можуть відображати комплексні зміни у біології ракової клітини, що супроводжують прогресію злякисного процесу і також пояснювати зниження стероїд-рецепторного статусу первинної пухлини в ході набуття нею злякисності, що відображається у результатах нашого дослідження – сильна негативна кореляція між експресією PR і помірна негативна кореляція між експресією ER та рівнем злякисності пухлини (табл. 3.1.2).

Серед всіх випадків захворювання, де відзначено прогресування злякисного процесу, основну частину зайняли тричі негативний РМЗ та Her2/neu позитивний (табл. 3.1.3). Цікаво, що гормононегативний ТНРМЗ найчастіше зустрічається у



низьких соціально-економічних групах [32]. За літературними даними, загалом він становить 15-20% всіх випадків РМЗ та наразі не має стандартного лікування, асоціюється із більшою кількістю рецидивів, швидшим ростом та гіршим прогнозом порівняно з іншими типами РМЗ [88]. У нашому дослідженні зафіксовано 16,5% випадків ТНРМЗ, що відповідає глобальним статистичним даним.

HER2/neu демонструє надмірну експресію у 18%-20% РМЗ і має прогностичне значення [89]. У нашому дослідженні відмічено 10,6% випадків пухлини, які експресують цей білок. Пухлини, які експресують Her2, характеризуються високим гістологічним ступенем злоякісності, найімовірніше метастазують і мають гірший прогноз [79]. Однак гіперекспресія Her2 також передбачає ефективну відповідь на анти-Her2 агенти, включаючи трастузумаб і лапатиніб [90].

Слід відзначити, що хоч наші дослідження і підтвердили важливу роль експресії ER та PR у прогнозі РМЗ, проте контрверсійні результати показали, що вони не можуть функціонувати як незалежні прогностичні фактори. Зокрема, негативна кореляція між експресією PR та рівнем злоякісності пухлини наголошує на важливості прогестеронового шляху у регулюванні клітинної біології РМЗ. Тому, для повноцінного прогнозу та розуміння механізмів злоякісного розвитку для розробки ефективного лікування захворювання, необхідно враховувати взаємодію різноманітних молекулярних компонентів, у тому числі і активність ферментів метаболізму естрогену (АФЕ).

Оскільки естроген суттєво залучений в розвиток РМЗ, можна очікувати, що локальне посилене виробництво гормона буде сприяти розвитку пухлинного вогнища. Якщо це так, можна було б очікувати особливого зв'язку між високою активністю ароматази в незмінній тканині молочної залози і рецептор-позитивною пухлиною. Проте у даному дослідженні таких асоціацій знайдено не було. Оскільки пухлина молочної залози загалом мала вищу АА (рис. 3.2.1), спостережена активність ферменту у незмінній тканині може бути наслідком мікрометастатичних відкладень злоякісних клітин у жирову тканину, як це було у випадку з регіонарними лімфатичними вузлами (рис. 3.2.2).

Єдиним фактором, який достовірно продемонстрував значний зв'язок з АА була ступінь злоякісності пухлини (табл. 3.2.2). Статистично значуща позитивна кореляція між АА та гістологічною класифікацією пухлини переконливо свідчить про те, що ракові клітини є основним джерелом активності ароматази у зразках пухлини. І хоча АА була виявлена і в незлоякісних компонентах молочної залози, її рівень був нижчим, ніж у пухлинній тканині (рис. 3.2.1). Тим не менше, оскільки близько 11% пухлин з високою злоякісністю демонстрували високий рівень ароматази і, навпаки, 0,4% пухлин з помірною злоякісністю не виявляли активності цього ферменту, стає очевидним, що інші фактори можуть впливати на біосинтез естрогену в пухлинах молочної залози.

Згідно з літературними даними, АА корелює з розвитком запальних процесів у грудній залозі [91]. Стало відомо, що у 50% випадків жінок з РМЗ у пременопаузі та більш ніж 70% жінок у постменопаузі збільшується кількість гістологічно видимих короноподібних структур у вісцеральній та підшкірній жирових тканинах молочної залози [92]. Утворення таких структур відбувається внаслідок інфільтрації імунокомпетентних клітин у місця загибелі дисфункціональних адипоцитів, що спричиняє збільшення рівнів медіаторів запалення, таких як інтерлейкін 6, простагландин Е2, фактор некрозу- $\alpha$  [93]. У відповідь на ці фактори збільшується експресія ароматази в стромальних клітинах молочної залози [94]. Тому очевидне, хоча і не достовірне, підвищення АА у тканині молочної залози жінок у пери- та постменопаузальному періодах (рис. 3.3) найімовірніше пов'язане з поширенням запалення у тканині молочної залози та збільшенням розмірів адипоцитів. У жінок з РМЗ у постменопаузі середній діаметр адипоцитів вищий, ніж у хворих у пременопаузі. При цьому АА прямо корелює з діаметром адипоцитів [92].

Таким чином, результати дослідження вказують на те, що тканина молочної залози є важливим місцем біосинтезу естрогену, особливо у жінок після менопаузи. Відкритим залишається лише питання про те, чи злоякісна пухлина стимулює активність ароматази в навколишній тканині, чи локально посилена активність

ферменту у жировій тканині створює місцеве середовище, яке сприяє злякисному розвитку.

Важливою знахідкою у нашому дослідженні взаємодії між клініко-патологічними факторами у жінок з РМЗ був спостережений сильний захисний ефект експресії STS від метастазування в регіонарні вузли та рецидиву захворювання (табл. 3.3.2). Не торкаючись потенціалу інгібування цього ферменту в рамках нового терапевтичного підходу у лікуванні РМЗ, відмічений захисний ефект може вказувати на можливі перспективи використання STS як потенційного прогностичного біомаркера у пацієнтів з РМЗ [95].

У контексті взаємодії з  $17\beta\text{HSD}$ , який виявив зворотні тенденції для тих самих клініко-патологічних факторів, наші дані вказують на можливий захисний механізм локалізованого синтезу потужних естрогенів через альтернативні стероїдні шляхи у пацієнтів з РМЗ.

Таким чином, отримані дані підкреслюють наявність і складність розширеного ендокринного/внутрішньокринного середовища раку молочної залози, а досліджувані ферменти разом з визначенням рецепторного статусу пухлини РМЗ вказують на потенційно перспективні напрямки для подальших досліджень та розвитку нових стратегій управління злякисним захворюванням.

## ВИСНОВКИ

У роботі проведено аналіз вікових, клінічних і морфологічних особливостей раку молочної залози, досліджено роль молекулярно-біологічних факторів у контексті аналізу механізмів розвитку цієї патології і можливість їх використання як прогностичних маркерів при оцінці розвитку злоякісного захворювання. Отримані в процесі дослідження результати дозволили зробити наступні висновки:

1. Сучасні вікові особливості раку молочної залози вказують на переважання цього захворювання у жінок старше 50 років (61,2 %). Особливістю гістологічного типу пухлин було переважання протоково інфільтруючого раку (79,0 %), найрідше зустрічався часточковий інфільтруючий рак молочної залози (6,0 %). Серед усіх гістологічних форм пухлин найчастіше зустрічався люмінальний-А підтип (59%). Частота випадків тричі негативного раку молочної залози відповідав глобальним тенденціям (16,5%), тоді як Her2/neu-позитивний зустрічався найрідше (10,6 %). Рівень 5-ти річної безрецидивної виживаності при раку молочної залози досягав майже 66%. Ранні рецидиви спостерігалися у 12% жінок та у 22,4% пацієток з тричі негативним та Her2/neu-позитивним раком молочної залози виявляли віддалені метастази

2. Аналіз взаємозв'язку між різними клініко-патологічними змінними та гормональним статусом пухлин підтвердив важливість естрогену в розвитку раку молочної залози, особливо у жінок після менопаузи. Виявлені кореляції між експресією PR ( $r = -0,71$ ) і ER ( $r = -0,54$ ) та G-статусом пухлини, а також зв'язок з рецидивами ( $r = -0,74$ ), підкреслюють роль стероїд-рецепторного статусу у регулюванні клітинної біології раку молочної залози. Відмічені збіги між стероїд-позитивним профілем у метастазі та статусом ER та PR рецепторів у первинному вогнищі свідчать про можливий спільний патогенетичний механізм у формуванні та подальшому розповсюдженні пухлини.

3. Встановлено, що активність ароматази не може бути рекомендована для використання як незалежний прогностичний маркер у хворих на рак молочної залози, оскільки не було виявлено прямого зв'язку між розміром первинної

пухлини, випадками рецидиву, віком пацієнок та рівнем активності досліджуваного ферменту у пухлинній тканині молочної залози. Єдиним фактором, який достовірно продемонстрував значний зв'язок з активністю ароматази була ступінь злоякісності пухлини: у пухлин з високою агресивністю (G3) активність ароматази або відсутня (10,5%), або низька (42,4%), у пухлинах з помірною злоякісністю (G2) найчастіше зустрічається висока ароматазна активність (20%).

4. Експресія STS виявлена як потенційний прогностичний біомаркер, пов'язаний з меншою частотою рецидивів ( $r = -1,37$ ;  $p < 0,05$ ) та метастазуванням ( $r = -1,8$ ;  $p < 0,001$ ). У контексті взаємодії з  $17\beta$ HSD, який виявив зворотні тенденції для частоти рецидивів ( $r = 1,4$ ;  $p = 0,03$ ), ці результати вказують на можливий захисний механізм локалізованого синтезу естрогенів через альтернативні стероїдні шляхи у пацієнтів з раком молочної залози.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Визначення вікових, гістологічних та молекулярно-біологічних особливостей раку молочної залози дозволяє індивідуалізувати підходи до діагностики та лікування, сприяючи точнішій стратифікації ризиків та вибору оптимальних терапевтичних стратегій.

1. Жінки понад 50 років відносяться до групи підвищеного ризику розвитку раку молочної залози.

2. При морфологічному дослідженні пухлин, жінок з тричі негативним та Her2/neu-позитивним раком молочної залози слід відносити до групи високого ризику рецидивів.

3. Якісний та кількісний аналіз активності ароматази у пухлинній тканині молочної залози не може розглядатися як незалежний прогностичний фактор. Разом з відсутністю експресії стероїдних рецепторів, низька чи відсутня активність ароматази вказує на високу агресивність пухлини та меншу спрямованість клітин на локальний синтез естрогенів у пухлині. Це слід враховувати при інтерпретації стероїдного рецепторного статусу та розробці індивідуальних підходів до лікування.

3. Для коректної оцінки перебігу та прогнозу раку молочної залози у хворих доцільно при імуногістохімічному дослідженні, окрім експресії ER і PR, звертати увагу на необхідність визначення STS та 17βHSD у пухлинній тканині молочної залози.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Breast cancer. World Health Organization (WHO). URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer/> (дата звернення: 28.12.2023).
2. Feng Y., Spezia M., Huang S., et al. Breast cancer development and progression: risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes & Diseases*. 2018. Vol. 5. P. 77–106.
3. Alkabban F.M., Ferguson T. Breast Cancer. *Treasure Island (FL)*: StatPearls Publishing. 2023. PMID: 29493913.
4. Basic Information About Breast Cancer. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). URL: [https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic\\_info/index.htm/](https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/index.htm/) (дата звернення 22.12.2023).
5. Brisken C, O'Malley B. Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Bioly*. 2010. Vol. 2, No 12. a003178.
6. Lange C. A., Yee D. Progesterone and breast cancer. *Womens Health (Lond)*. 2008. Vol. 4, No 2. P. 151–162.
7. Satpathi S., Gaurkar S. S., Potdukhe A., et al. Unveiling the Role of Hormonal Imbalance in Breast Cancer Development: A Comprehensive Review. *Cureus*. 2023. Vol. 15, No 7. e41737.
8. Horwitz K. B., Sartorius C. A. 90 Years of Progesterone: Progesterone and Progesterone Receptors in Breast Cancer: Past, Present, Future. *Journal of molecular endocrinology*. 2020. Vol. 65, No 1. P. 49–63.
9. Clusan L., Le Goff P., Flouriot G., et al. A Closer Look at Estrogen Receptor Mutations in Breast Cancer and Their Implications for Estrogen and Antiestrogen Responses. *International journal of molecular sciences*. 2021. Vol. 22, No 2. 756.
10. Bhardwaj P., Au C. C., Benito-Martin A., et al. Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2019. Vol. 189. P. 161–170.

11. Luu-The V., Zhang Y., Poirier D., et al. Characteristics of human types 1, 2 and 3 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: oxidation/reduction and inhibition. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1995. Vol. 55, No 5-6. P. 581–587.
12. Nokelainen P., Puranen T., Peltoketo H., et al. Molecular cloning of mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and characterization of enzyme activity. *European journal of biochemistry*. 1996. Vol. 236, No 2. P. 482–490.
13. Al Sarakbi W., Mokbel R., Salhab M., et al. The role of STS and OATP-B mRNA expression in predicting the clinical outcome in human breast cancer. *Anticancer research*. 2006. Vol. 26, No 6C. P. 4985–4990.
14. Geisler J., Sasano H., Chen S., et al. Steroid sulfatase inhibitors: promising new tools for breast cancer therapy? *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2011. Vol. 125, No 1-2. P. 39–45.
15. Федоренко З. П., Гулак Л. О., Михайлович Ю. Й., і ін. Рак в Україні, 2021-2022. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. *Бюлетень Національного канцер-реєстру України*. 2023. № 24. С. 16–18.
16. Arnold M., Morgan E., Rungay H., et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *Breast (Edinburgh, Scotland)*. 2022. Vol. 66. P. 15–23.
17. Abdulkareem I. H. Aetio-pathogenesis of breast cancer. *Nigerian medical journal : journal of the Nigeria Medical Association*. 2013. Vol. 54, No 6. P. 371–375.
18. Momenimovahed Z., Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast cancer (Dove Medical Press)*. 2019. Vol. 11. P. 151–164.
19. Aghajanzadeh M., Torabi H., Najafi B., et al. Intermammary breast cancer: A rare case of cancer with origin of breast cells in an unusual location. *SAGE open medical case reports*. 2023. Vol. 11. 2050313X231154996.
20. Parthasarathy V., Rathnam U. Nipple discharge: an early warning sign of breast cancer. *International journal of preventive medicine*. 2012. Vol. 3, No 11. P. 810–814.



21. Севідов В. В., Касевич Н. М. Онкологія: підручник, 2-е видання. Київ, ВСВ «Медицина», 2013. С. 46–53.
22. Yazıcı H., Akin B. Molecular Genetics of Metastatic Breast Cancer. Tumor Progression and Metastasis. *IntechOpen*. 2020. URL: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.86674>.
23. Weinberg O. K., Marquez-Garban D. C., Pietras, R. J. New approaches to reverse resistance to hormonal therapy in human breast cancer. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2005. Vol. 8, No 4. P. 219–233.
24. Gancberg D., Lespagnard L., Rouas G., et. al. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples of invasive breast carcinomas. Correlation with oncogene amplification in 160 cases. *American journal of clinical pathology*. 2000. Vol. 113, No 5. P. 675–682.
25. Ajani M. A., Salami A., Awolude O. A., et. al. The expression status of human epidermal growth factor receptor 2 in epithelial ovarian cancer in Ibadan. *Southern African Journal of Gynaecological Oncology*. 2016. Vol. 8, No 1. P. 9–13.
26. Lashkarizadeh M., Lashkarizadeh M., Nikian M., et al. The expression of HER2/neu in patients with lung cancer and its associated factors. *The clinical respiratory journal*. 2023. Vol. 17, No 2. P. 90–95.
27. Amisha F., Malik A P., Saluja P., et al. Comprehensive Review on the Role of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) as a Biomarker in Extra-Mammary and Extra-Gastric Cancers. *Onco*. 2023. Vol. 3, No 2. P. 96–124.
28. Rout T., Singh A., Epari V., et al. HER 2/neu Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinoma and Its Clinico-Pathological Association at a Tertiary Care Center in Eastern India. *Indian journal of otolaryngology and head and neck surgery: official publication of the Association of Otolaryngologists of India*. 2022. Vol. 74, S. 2. P. 2430–2434.
29. Alataki A., Dowsett M. Human epidermal growth factor receptor-2 and endocrine resistance in hormone-dependent breast cancer. *Endocrine-related cancer*. 2022. Vol. 29, No 8. P. 105–122.

30. Swain S. M., Miles D., Kim S. B., et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet. Oncology*. 2020. Vol. 21, No 4. P. 519–530.
31. Hossain F., Danos D., Prakash O., et al. Neighborhood Social Determinants of Triple Negative Breast Cancer. *Frontiers in public health*. 2019. Vol. 7. 18. URL: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00018>
32. Li Z., Wei H., Li S., et al. The Role of Progesterone Receptors in Breast Cancer. *Drug design, development and therapy*. 2022. Vol. 16. P. 305–314.
33. Fuentes N., Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*. 2019. Vol. 116. P. 135–170.
34. Mohammed H., Russell I. A., Stark R., et al. Progesterone receptor modulates ER $\alpha$  action in breast cancer. *Nature*. 2015. Vol. 523, No 7560. P. 313–317.
35. Van Asten K., Slembrouck L., Olbrecht S., et al. Prognostic Value of the Progesterone Receptor by Subtype in Patients with Estrogen Receptor-Positive, HER-2 Negative Breast Cancer. *The oncologist*. 2019. Vol. 24, No 2. P. 165–171.
36. Santin A. P., Furlanetto T. W. Role of estrogen in thyroid function and growth regulation. *Journal of thyroid research*. 2011. Vol. 2011. 875125. URL: <https://doi.org/10.4061/2011/875125>.
37. Meng Q., Li, Y., Ji T., et al. Estrogen prevent atherosclerosis by attenuating endothelial cell pyroptosis via activation of estrogen receptor  $\alpha$ -mediated autophagy. *Journal of advanced research*. 2020. Vol. 28. P. 149–164.
38. Tingskov S. J., Mutsaers H. A. M., Nørregaard, R. Estrogen regulates aquaporin-2 expression in the kidney. *Vitamins and hormones*. 2020. Vol. 112. P. 243–264.
39. Obr A. E., Edwards D. P. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012. Vol. 357, No 1-2. P. 4–17.
40. Sasada S., Kondo N., Hashimoto H., et al. Prognostic impact of adjuvant endocrine therapy for estrogen receptor-positive and HER2-negative T1a/bN0M0 breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2023. Vol. 202, No 3. P. 473–483.

41. Ewan K.B., Oketch-Rabah H. A., Ravani S. A., et al. Proliferation of estrogen receptor-alpha-positive mammary epithelial cells is restrained by transforming growth factor-beta1 in adult mice. *The American journal of pathology*. 2005. Vol. 167, No 2. P. 409–417.
42. Yager J.D. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention--A review. *Steroids*.— 2015. Vol. 99, Pt A. P. 56–60.
43. Xu J., Chen Y., Olopade O.I. MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer*. 2010. Vol. 1, No 6. P. 629–640.
44. Liehr J. G. Is Estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen? *Endocrine reviews*. 2000. Vol. 21, No 1. P. 40–54.
45. Hiraku Y., Yamashita N., Nishiguchi M., et al. Catechol estrogens induce oxidative DNA damage and estradiol enhances cell proliferation. *International journal of cancer*. 2001. Vol. 92, No 3. P. 333–337.
46. Trabert B., Bauer D. C., Buist D. S. M., et al. Association of Circulating Progesterone with Breast Cancer Risk Among Postmenopausal Women. *JAMA network open*. 2020. Vol. 3, No 4. e203645. URL: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.3645>.
47. Beleut M., Rajaram R. D., Caikovski M., et al. Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. Vol. 107, No 7. P. 2989–2994.
48. Perou C. M., Sørlie T., Eisen M. B. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000. Vol. 406, No 6797. P.747–752.
49. Creighton C. J., Kent Osborne C., van de Vijver M. J., et al. Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. *Breast Cancer Research Treatment*. 2009. Vol. 114, No 2. P. 287–299.
50. Daško M., Demkowicz S., Biernacki K. Recent progress in the development of steroid sulphatase inhibitors - examples of the novel and most promising compounds from

the last decade. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2020. Vol. 35, No 1. P. 1163–1184.

51. Patel S. Disruption of aromatase homeostasis as the cause of a multiplicity of ailments: A comprehensive review. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017. Vol. 168. P. 19–25.

52. Wang L., Ellsworth K. A., Moon I., et al. Functional genetic polymorphisms in the aromatase gene CYP19 vary the response of breast cancer patients to neoadjuvant therapy with aromatase inhibitors. *Cancer research*. 2010. Vol. 70, No 1. P. 319–328.

53. Yaghjian L., Colditz G. A. Estrogens in the breast tissue: a systematic review. *Cancer causes and control*. 2011. Vol. 22, No 4. P. 529–540.

54. Schneider R., Barakat A., Phippen J., et al. Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer in post-menopausal female patients: an update. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 2011. Vol. 3. P. 113–125.

55. Lachman H. M., Papolos D. F., Saito T., et al. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*. 1996. Vol. 6, No 3. P. 243–250.

56. Cavalieri E. L., Stack D. E., Devanesan P. D., et al. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997. Vol. 94. P. 10937–10942.

57. Vavilin V. A., Safronova O. G., Manankin N. A., et al. Glutathione-S-Transferase Polymorphism and Clinical Features of Acute Drug Poisoning in Children. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2005. Vol. 139, No 4. P. 431–433.

58. Ściskalska M., Milnerowicz H. The role of GST $\pi$  isoform in the cells signalling and anticancer therapy. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2020. Vol. 24, No 16. P. 8537–8550.

59. Ambrosone C. B., Freudenheim J. L., Graham S., et al. Cytochrome P450 1A1 i glutathione-s-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Research*. 1995. Vol. 55. P. 3483–3485.

60. García-Closas M., Kelsey K. T., Hankinson, S. E., et al. Glutathione S-transferase mu and theta polymorphisms and breast cancer susceptibility. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999. Vol. 91, No 22. P. 1960–1964.
61. Kelsey K. T., Hankinson S. E., Colditz G. A. Glutathione S-transferase class m deletion polymorphism and breast cancer: results from prevalent versus incident cases. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 1997. Vol. 6. P. 511–515.
62. Huang J., Tan P. H., Thiyagarajan J., et al. Prognostic significance glutathione S-transferase-pi in invasive breast cancer. *Modern pathology*. 2003. Vol. 16, No 6. P. 558–565.
63. Rebbeck T.R. Molecular epidemiology of human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 i GSTT1 B cancer susceptibility *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*. 1997. Vol. 6. P. 733–743.
64. Han D. F., Zhou X., Hu M. B., et al. Polymorphisms of estrogen-metabolizing genes and breast cancer risk: a multigenic study. *Chinese medical journal*. 2005. Vol. 118, No 18. P.1507–1516.
65. Lipton A., Santen R. J., Santner S. J., et al. Prognostic value of breast cancer aromatase. *Cancer*. 1992. Vol. 70. P. 1951–1955.
66. Evans T. R., Rowlands M. G., Silva M. C., et al. Prognostic significance of aromatase and estrone sulfatase enzymes in human breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1993. Vol. 44, No 4-6. P. 583–587.
67. Evans T. R., Rowlands M. G., Law M., et al. Intratumoral oestrone sulphatase activity as prognostic marker B human breast carcinoma. *British journal of cancer*. 1994. Vol. 69, No 3. P. 555–561.
68. Sasano H., Frost A. R., Saitoh R.. Aromatase and 17 beta- hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996. Vol. 81, No 11. P. 4042–4046.
69. Sasano H., Harada N. Intratumoral aromatase in human breast, endometrial, and ovarian malignancies. *Endocrine reviews*. 1998. Vol. 19, No 5. P. 593–607.
70. Pasqualini J. R., Chetrite G., Blacker C., et al. Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1996. Vol. 81, No 4. P. 1460–1464.

71. Shea T. C., Claflin G., Comstock K. E., et al. Glutathione transferase activity and isoenzyme composition in primary human breast cancers. *Cancer Research*. 1990. Vol. 50, No 21. P. 6848–6853.
72. Matsui A., Ikeda T., Enomotosoda K., et al. Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes. *Cancer letters*. 2000. Vol. 151, No 1. P. 87–95.
73. Suzuki M., Ishida, H., Shiotsu, Y., et al. Expression level of enzymes related to in situ oestrogen synthesis and clinicopathological parameters in breast cancer patients. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2009. Vol. 113, No 3-5. P. 195–201.
74. Шевченко Т. М., Гадзюк П. В., Бондар А. М., і ін. Імуногістохімічне дослідження для діагностики інфільтративних форм раку молочної залози та визначення молекулярного підтипу в жінок різного віку м. Дніпро. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Т.8, № 2. С. 204–209.
75. O'Neill J., Miller W. Aromatase activity in breast adipose tissue from women with benign and malignant breast diseases. *British journal of cancer*. 1987. Vol. 56, No 5. P. 601–604.
76. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Randall R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
77. Suzuki T., Nakata T., Miki Y., et al. Oestrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma. *Cancer Research*. 2003. Vol. 63. P. 2762–2770.
78. Siddarth B. R., Kumar A., Kumar S., et al. Clinicopathologic study of infiltrating carcinoma of breast and correlation with the ER/PR status. *Journal of Evolution of Medical and Dental Science*. 2016. Vol. 5. P. 1025–1032.
79. Dayal A., Shah R. J., Kothari S., et al. Correlation of Her-2/neu status with estrogen, progesterone receptors and histologic features in breast carcinoma. *APALM*. 2016. Vol. 3. P. 476–483.

80. Lethaby A. E., Mason B. H., Harvey V. J., et al. Survival of women with node negative breast cancer in the Auckland region. *New Zealand Medical Journal*. 1996. Vol. 109. P. 330–333.
81. Collett K., Hartveit F., Skjarven R., et al. Prognostic role of oestrogen and progesterone receptors in patients with breast cancer in relation to age and lymph node status. *Journal of Clinical Pathology*. 1996. Vol. 49. P. 920–925.
82. Pichon M. F., Broet P., Magdelenat H., et al. Prognostic value of steroid receptors after long-term follow-up of 2257 operable breast cancers. *British Journal of Cancer*. 1996. Vol. 73. P. 1545–1551.
83. Costa S.-D., Lange S., Klinga K., et al. Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer—results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up. *European Journal of Cancer*. 2002. Vol. 38, No 10. P. 1329–1334.
84. Hilton H. N., Clarke C. L., Graham J. D. Estrogen and progesterone signalling in the normal breast and its implications for cancer development. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2018. Vol. 466. P. 2–14.
85. Cheng C. H., Chen L. R., Chen K. H. Osteoporosis due to hormone imbalance: an overview of the effects of estrogen deficiency and glucocorticoid overuse on bone turnover. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. Vol. 23. P. 1376.
86. Calaf G. M., Ponce-Cusi R., Aguayo F., et al. Endocrine disruptors from the environment affecting breast cancer. *Oncology letters*. 2020. Vol. 20. P. 19–32.
87. Madu C. O., Wang C. O., Madu S., et al. Angiogenesis in breast cancer progression, diagnosis, and treatment. *Journal of Cancer*. 2020. Vol. 11. P. 4474–4494.
88. . Zagami P., Carey L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *NPJ Breast Cancer*. 2022. Vol. 8, No 1. – P. 95.
89. Nabi M. G., Ahangar A., Kaneez S. Estrogen receptors, progesterone receptors and their correlation with respect to HER-2/neu status, histological grade, size of lesion, lymph node metastasis, lymphovascular involvement and age in breast cancer patients in a hospital in north India. *Asian Journal of Medical Sciences*. 2016. Vol. 7. P.

90. Zhang X., Leng J., Zhou Y., et al. Efficacy and Safety of Anti-HER2 Agents in Combination with Chemotherapy for Metastatic HER2-Positive Breast Cancer Patient: A Network Meta-Analysis. *Frontiers in oncology*. 2021. Vol. 11. P. 731210.
91. Cinti S., Mitchell G., Barbatelli G., et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *Journal of lipid research*. 2005. Vol. 46, No 11. P. 2347–2355.
92. Brown K. A., Iyengar N. M., Zhou X. K., et al. Menopause Is a Determinant of Breast Aromatase Expression and Its Associations with BMI, Inflammation, and Systemic Markers. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2017. Vol. 102, No 5. P. 1692–1701.
93. Bhardwaj P., Brown K. A. Obese Adipose Tissue as a Driver of Breast Cancer Growth and Development: Update and Emerging Evidence. *Frontiers in oncology*. 2021. Vol. 11. 638918.
94. Mair K. M., Gaw R., MacLean M. R. Obesity, estrogens and adipose tissue dysfunction – implications for pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*. 2020. Vol. 10, No 3. 2045894020952019.
95. Foster P. A., Chander S. K., Newman S. P., et al. A new therapeutic strategy against hormone-dependent breast cancer: the preclinical development of a dual aromatase and sulfatase inhibitor. *Clinical cancer research*. 2008. Vol. 14. P. 6469–6477.