

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний університет

Факультет 2 медичний

УДК 618.19-006.6-074/-076

Лукащук Іванна Іванівна

Група 2

**Клінічне значення експресії білка p53 на індукований апоптоз
моноцитів в нормі та 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:

кандидат медичних наук,

в.о. завідувача кафедри

онкології та онкохірургії

Щуров Микола Федорович

Запоріжжя, 2023 р

Міністерство охорони здоров'я України
Запорізький державний медичний 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

**Клінічне значення експресії білка p53 на індукований апоптоз
 моноцитів в нормі та при раку молочної залози.**

Студентки Лукашук Іванни Іванівни

Група 2

КЕРІВНИК РОБОТИ в. о. завідувача кафедри онкології та онкохірургії,
кандидат медичних наук, доцент

Щуров Микола Федорович

РЕЦЕНЗЕНТ кандидат медичних наук, доцент онкології та
онкохірургії, зав. відділення урології ЗОКЛ

Мерзляк Сергій Віталійович

Робота розглянута на засіданні кафедри (протокол № 4 від „20” грудня 2022 р.) і допущена до захисту.

В.О.ЗАВІДУВАЧА КАФЕДРИ

Кандидат медичних наук, доцент

Щуров Микола Федорович

Запоріжжя, 2023 р

Реферат

Магістерська робота: 56 сторінок, 8 таблиць, 9 малюнків, 31 літературних джерел.

Актуальність роботи. Рак молочної залози серед жіночого населення – найпоширеніше онкологічне захворювання у світі. Протягом свого життя на рак молочної залози буде хворіти приблизно кожна дванадцята жінка. Рак молочної залози є головною причиною смерті жінок від онкологічних захворювань. За даними Національного канцер-реєстру, у 2020 році в Україні зареєстрували 12 824 випадків раку молочної залози (12 736 жінок та 88 чоловіків), а 4 998 людей померли внаслідок цієї недуги (4 960 жінок і 38 чоловіків) — без урахування даних Донецької, Луганської областей, АР Крим та м. Севастополь. Тобто, на кожні 10 нових випадків захворювання в Україні реєструють 3 смерті від нього. Кожній четвертій жінці рак грудей діагностують вже на III–IV стадії, коли ефективність лікування значно знижується. Рак виліковний за умови його виявлення на I стадії — у 95% жінок, на II стадії — у 80%, на III стадії— у 50% жінок. Регулярні профілактичні огляди у лікаря суттєво підвищують шанси на ефективне лікування. За даними ВООЗ, 21% усіх випадків смерті від раку молочної залози у світі спричинено вживанням алкоголю, зайвою вагою й ожирінням, а також фізичною інертністю [1]. Рак молочної залози міцно утримує перше місце в структурі онкологічної захворюваності у жінок. У зв'язку з широким впровадженням в патологічну практику імуногістохімічного методу дослідження з'явилась можливість поглибити діагностику захворювання, та індивідуалізувати методи лікування хворих на рак молочної залози. Імуногістохімічні маркери, що відображають фундаментальні біологічні властивості і функціональний стан пухлин клітини, відіграють важливу роль в оцінці перебігу захворювання і результат лікування онкологічних захворювань. Однак через велику кількість потенційно значущих молекулярно-біологічних факторів і істотних розбіжностей в даних, представлених в літературі, по їх прогностичній цінності, вибір того чи іншого виду терапії, виходячи з біологічних особливостей пухлини, залишається складним і невизначеним для лікаря [4]. Одним з таких маркерів є білок p53.

Мутація p53 є найпоширенішим генетичним дефектом раку багатьох місць і зустрічається приблизно в 20% «спорадичних» випадків і в половині сімейних випадків раку молочної залози. Лабораторні дослідження встановили, що клітини з мутацією білка p53 стабільні до впливу радіації та хіміотерапії препаратів, які зазвичай викликають апоптоз. Наявні повідомлення про негативні впливи мутантного білка p53 на безпрецедентну захворюваність і загальну вживаність хворих на рак молочної залози. Однак питання про взаємозв'язок вираження мутантного p53 з тенденцією прогресування пухлини на ранніх стадіях захворювання, зокрема, з розвитком метастазів раку молочної залози в регіональних лімфатичних вузлах (РЛУ), вивчені недостатньо [2, 3].

При онкологічних захворюваннях, зокрема, при раку молочної залози, спостерігається моноцитоз – збільшення кількості моноцитів. Моноцити або макрофаги відповідають на вплив різноманітних агоністів, швидко гідролізуючи мембранні фосфоліпіди, що призводить до генерації великої кількості внутрішньоклітинних та екстраклітинних месенджерів, внаслідок чого реалізується багатофункціональний потенціал цих клітин [5]. Однак при підході до пухлини моноцити або макрофаги втрачають свою рухливість, а також можливість передавати інформацію про виявлену пухлину іншим імунокомпетентним клітинам [6]. У той же час досі ряд питань, що стосуються поведінки моноцитів, вивчені недостатньо. Зокрема, показано, що в моноцитах посилюється ліпідний метаболізм, інтенсифікуються процеси пероксидації ліпідів [7].

Мета роботи: Метою роботи є визначення взаємозв'язку експресії мутантного білка p53 в пухлинних клітинах хворого на рак молочної залози та час його вступу в дію і запуску апоптозу моноцитів у здорової людини.

Дані, що планується отримати, дозволять поліпшити рівень діагностики злоякісних новоутворень молочної залози.

Задачі дослідження:

1. Дослідити основні характеристики раку молочної залози.
2. Визначити причини та методи запуску мутантного p53, що зупиняє апоптоз моноцитів при раку молочної залози.

3. Дослідити основи ранньої діагностики злоякісних пухлин молочної залози.

Об'єкт дослідження – жінки, що хворіють раком молочної залози.

Предмет дослідження – макроскопічна, імуногістохімічна характеристика раку молочної залози.

Методи дослідження. Імунологічний, гістологічний та статистичний методи дослідження.

Елементи наукової новизни. В ході проведеної роботи отримано результати, що підтверджують наукові положення, та вивчено патологічні зміни в молочній залозі, які призводять до різних ступенів злоякісності рака молочної залози. Це змушує змінити тактику діагностики та лікування злоякісних пухлин молочної залози, веде до удосконалення наявних даних щодо епізодів раку у людини, пов'язаних з мутацією p53 — пухлинного білка-супресора, та визначення методів запуску мутованого p53, що зупиняє апоптоз моноцитів при раку молочної залози. Практична цінність роботи полягає у можливості оцінювання ризиків прогресування хвороби на рак молочної залози. За допомогою визначення експресії маркерів p53, CA-15-3 можливо прогнозувати ефективність хіміотерапії. Результати досліджень будуть впроваджені в практичну діяльність лікарів та застосовані при подальших наукових дослідженнях.

Практичне значення. Очікується отримати нові дані щодо можливостей сучасних методів діагностики раку молочної залози імуногістохімічними методами, які тільки набирають силу, та дозволять підвищити рівень діагностики злоякісних пухлин.

Перелік ключових слів: білок p53, апоптоз моноцитів, рак молочної залози, мамографія.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ЗН – ЗЛОЯКІСНІ НОВОУТВОРЕННЯ

РМЗ – РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

ПТ – ПРОМЕНЕВА ТЕРАПІЯ

УЗД- УЛЬТРАЗВУКОВЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

КТ- КОМП'ЮТЕРНА ТОМОГРАФІЯ

МРТ- МАГНІТНО-РЕЗОНАНСНА ТОМОГРАФІЯ

ІГХ – ІМУНОГІСТОХІМІЧНІ

ІМПЗ – ІМУНОПОЗИТИВНІ

ІП – ІНДЕКС ПРОЛІФЕРАЦІЇ

ЛВ – ЛІМФАТИЧНІ ВУЗЛИ

ТГАБ- ТОНКОГОЛЬНА АСПІРАЦІЙНА БІОПСІЯ

РМЕ- РАДІКАЛЬНА МАСТЕКТОМІЯ

РЛВ – РЕГІОНАРНІ ЛІМФАТИЧНІ ВУЗЛИ

МГМ- МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ

АДЛ- АДЬЮВАНТНЕ ЛІКУВАННЯ

ПРМЗ- ПРЕІНВАЗИВНИЙ РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

ФКМ- ФІБРОЗНО-КІСТОЗНА МАСТОПАТІЯ

FISH- ТЕСТ-ФЛУОРЕСЦЕНТНА ГІБРИДИЗАЦІЯ

ЗМІСТ

ВСТУП	9
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ	13
1.1. Функціональна роль білка p53, його структура та клітинний обмін	13
1.2. Функції моноцитів при апоптозі	16
1.3. Індуктори та інгібітори апоптозу	18
1.4. Загальна характеристика CA-15-3 та p53	20
1.5. Маркер сироватки крові при раку молочної залози	21
1.6. Користь від комбінації маркерів PEA, CA15-3, p 53	22
1.7. Особливості скринінгу раку молочної залози	23
1.8 Класифікація раку молочної	25
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	27
2.1. Матеріали дослідження. Загальна характеристика досліджуваних груп	27
2.2. Методи дослідження	29
2.2.1. Імунологічний метод	30
2.2.2. Патогістологічний метод	31
2.2.3. Комп'ютерна томографія	33
2.2.4. УЗД Ультразвукове дослідження лімфовузлів	34
2.2.5. Статистичні методи дослідження	35
2.3. Оцінка прогностичної ролі маркерів	36
2.3.1. Визначення методом Каплана - Мейера аналізу виживаності	36
2.3.2. Порівняння функцій виживаності для III та IV стадії за допомогою «Logranktest»	37
2.3.3. Визначення впливу експресії маркерів на функцію виживаності за допомогою пропорційної моделі Кокса	37
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ	39
3.1. Визначення підтипу пухлин, за допомогою гістологічних досліджень	39
3.2 Визначення підтипу пухлини, за допомогою ІГХ дослідження	42
ВИСНОВКИ	52

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ	53
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	54

ВСТУП

Рак молочної залози серед жіночого населення – найпоширеніше онкологічне захворювання у світі. Протягом свого життя на рак молочної залози буде хворіти приблизно кожна дванадцята жінка. Рак молочної залози є головною причиною смерті жінок від онкологічних захворювань. За даними Національного канцер-реєстру, у 2020 році в Україні зареєстрували 12 824 випадків раку молочної залози (12 736 жінок та 88 чоловіків), а 4 998 людей померли внаслідок цієї недуги (4 960 жінок і 38 чоловіків) — без урахування даних Донецької, Луганської областей, АР Крим та м. Севастополь. Тобто, на кожні 10 нових випадків захворювання в Україні реєструють 3 смерті від нього. Кожній четвертій жінці рак грудей діагностують вже на III–IV стадії, коли ефективність лікування значно знижується. Рак виліковний за умови його виявлення на I стадії — у 95% жінок, на II стадії — у 80%, на III стадії — у 50% жінок. Регулярні профілактичні огляди у лікаря суттєво підвищують шанси на ефективне лікування. За даними ВООЗ, 21% усіх випадків смерті від раку молочної залози у світі спричинено вживанням алкоголю, зайвою вагою й ожирінням, а також фізичною інертністю [1]. Рак молочної залози міцно утримує перше місце в структурі онкологічної захворюваності у жінок. У зв'язку з широким впровадженням в патологічну практику імуногістохімічного методу дослідження з'явилась можливість поглибити діагностику захворювання, та індивідуалізувати методи лікування хворих на рак молочної залози. Імуногістохімічні маркери, що відображають фундаментальні біологічні властивості і функціональний стан пухлин клітини, відіграють важливу роль в оцінці перебігу захворювання і результат лікування онкологічних захворювань. Однак через велику кількість потенційно значущих молекулярно-біологічних факторів і істотних розбіжностей в даних, представлених в літературі, по їх прогностичній цінності, вибір того чи іншого виду терапії, виходячи з біологічних особливостей пухлини, залишається складним і невизначеним для лікаря [4]. Одним з таких маркерів є білок p53. Мутація p53 є найпоширенішим генетичним дефектом раку багатьох місць і зустрічається приблизно в 20% «спорадичних» випадків і в половині сімейних випадків раку молочної залози. Лабораторні дослідження встановили, що клітини

з мутацією білка p53 стабільні до впливу радіації та хіміотерапії препаратів, які зазвичай викликають апоптоз. Наявні повідомлення про негативні впливи мутантного білка p53 на безпрецедентну захворюваність і загальну вживаність хворих на рак молочної залози. Однак питання про взаємозв'язок вираження мутованого p53 з тенденцією прогресування пухлини на ранніх стадіях захворювання, зокрема, з розвитком метастазів раку молочної залози в регіональних лімфатичних вузлах (РЛУ), вивчені недостатньо [2, 3].

При онкологічних захворюваннях, зокрема, при раку молочної залози, спостерігається моноцитоз – збільшення кількості моноцитів. Моноцити або макрофаги відповідають на вплив різноманітних агоністів, швидко гідролізуючи мембранні фосфоліпіди, що призводить до генерації великої кількості внутрішньоклітинних та екстраклітинних месенджерів, внаслідок чого реалізується багатофункціональний потенціал цих клітин [5]. Однак при підході до пухлини моноцити або макрофаги втрачають свою рухливість, а також можливість передавати інформацію про виявлену пухлину іншим імунокомпетентним клітинам [6]. У той же час досі ряд питань, що стосуються поведінки моноцитів, вивчені недостатньо. Зокрема, показано, що в моноцитах посилюється ліпідний метаболізм, інтенсифікуються процеси пероксидації ліпідів [7].

Рак молочної залози – найбільш поширене злоякісне захворювання серед жінок. Для проведення наукових і клінічних досліджень застосовують величезний набір всіляких методів і методик, а іноді і їх поєднання. Тим часом рак молочної залози – це непластичний процес, що характеризується «нестримною» проліферацією атипових клітин, пов'язаної з експресією протоонкогенів на тлі пригнічення активності супресії генів і генів апоптозу [8].

До загальних закономірностей розвитку малігнізації клітин різної морфофункціональної організації відносяться аплазія, ме'таплазія, дисплазія, а також формування інвазійного, деструктивного росту і метастазування малігнізованих клітин. Клінічно значущі метастази з'являються лише після багатоетапного відбору та прогресування надзвичайно агресивних атипових клітин на тлі багатократних генних мутацій і хромосомних аберації або епігеномних

механізмів дії різноманітних канцерогенів фізичної, хімічної та біологічної природи [2].

Мета роботи: Метою роботи є визначення взаємозв'язку експресії мутованого білка p53 в пухлинних клітинах хворого на рак молочної залози та час його вступу в дію і запуску апоптозу моноцитів у здорової людини.

Дані, що планується отримати, дозволять поліпшити рівень діагностики злоякісних новоутворень молочної залози.

Задачі дослідження:

1. Дослідити основні характеристики раку молочної залози.
2. Визначити причини та методи запуску мутованого p53, що зупиняє апоптоз моноцитів при раку молочної залози.
3. Дослідити основи ранньої діагностики злоякісних пухлин молочної залози.

Об'єкт дослідження – жінка, що хворіє на рак молочної залози.

Предмет дослідження – макроскопічна, імуногістохімічна характеристика раку молочної залози.

Методи дослідження. Імунологічний, гістологічний та статистичний методи дослідження.

Елементи наукової новизни. В ході проведеної роботи отримано результати, що підтверджують наукові положення, та вивчено патологічні зміни в молочної залозі, які призводять до різних ступенів злоякісності раку молочної залози. Це змушує змінити тактику діагностики та лікування злоякісних пухлин молочної залози, веде до удосконалення наявних даних щодо епізодів раку у людини, пов'язаних з мутацією p53 — пухлинного білка-супресора, та визначення методів запуску мутованого p53, що зупиняє апоптоз моноцитів при раку молочної залози. Практична цінність роботи полягає у можливості оцінювання ризиків прогресування хвороби на рак молочної залози. За допомогою визначення експресії маркерів p53, CA-15-3 можливо прогнозувати ефективність хіміотерапії. Результати досліджень будуть впроваджені в практичну діяльність лікарів та застосовані при подальших наукових дослідженнях.

Практичне значення. Очікується отримати нові дані щодо можливостей сучасних методів діагностики раку молочної залози імуногістохімічними методами, які тільки набирають силу, та дозволять підвищити рівень діагностики злоякісних пухлин.

РОЗДІЛ І.

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДАНИХ

1.1. Функціональна роль білка p53, його структура та клітинний обмін.

Функціональна роль білка p53.

Білок p53 (чи його ген) активується у відповідь на різноманітні ушкодження клітинної структури :

- непрепаровані розриви і інші ушкодження ДНК.
- порушення розбіжності хромосом в мітозі.
- руйнування мікро трубочок і т. д.

Сам же білок p53 регулює активність, принаймні, трьох груп генів:

1) активує гени (P21, GADD45 та ін.), що відповідають за зупинку клітинного поділу.

2) активує гени (BAX, KILLER/DR5, PIG та ін.), які запускають апоптоз - процес, що призводить, шляхом активації спеціальних ферментів, до загибелі клітини; а також репресує гени (BCL2, RELA), стримуючі апоптоз.

3) активує гени (TSP1, BAI1 та ін.), що гальмують ангиогенез (утворення нових судин). У результаті через посередництво білку p53 клітина у відповідь на ушкодження своєї структури

- або затримується на тій або іншій стадії мітотичного циклу і виправляє ці ушкодження;

- або (при неможливості виправлень) взагалі зупиняє поділ і вступає в процес клітинного старіння (фаза III по Хейфлику);

- або (при потенційній небезпеці пошкодженої клітини для її оточення) здійснює апоптоз, тобто, попросту кажучи, самогубство.

Зокрема, апоптозу, окрім інших, піддаються і клітини, в яких сталася пухлинна трансформація. В зв'язку з цим зрозуміло, чому одночасно гальмується ангиогенез - це ще один спосіб обмеження пухлинного зростання.

Тому білок p53 – один з найбільш важливих пухлинних супресорів. У більшості ж пухлин, що розвиваються, функції білку p53 опиняються в тому або іншому відношенні порушеними [9].

Білок p53 не входить ні в одну з тих родин ДНК-зв'язуючих білків, які були описані вище. У його молекулі - 392 амінокислотні залишки, що утворюють шість різних за розміром і функціями доменів.

Центральний і найбільший домен (що включає близько 200 залишків) відповідає за впізнавання енхансерів генів-мішеней і зв'язування з ними.

А найперший від N-конца (N-кінцевої) домен бере участь у взаємодії із загальними чинниками транскрипції, тобто з комплексом TFIID. Іншими словами, саме два названі домени забезпечують правильне зв'язування білку p53 з його основними партнерами [10].

Але це зв'язування знаходиться під контролем багаточисленних чинників.

Так, в тому ж N-домени є локус зв'язування з білком-інгібітором Mdm2, який блокує взаємодію з комплексом TFIID. І тут же присутні залишки серина і треоніна, які можуть фосфорилювати спеціальними протеїнкіназами (ДНК протеїнкіназою, білком АТМ та ін.).

Ці кинази активуються при ушкодженнях ДНК і інших структур клітини. Їх дія на N-домен, а також, мабуть, на сам інгібітор Mdm2 вивільняє цей домен з-під блокуючого впливу: він набуває здатності взаємодіяти з комплексом TFIID.

Взаємодія центрального домена з енхансером теж знаходиться під контролем, який знову здійснюється шляхом модифікації. Але безпосереднім об'єктом модифікації є не центральний, а С-кінцевий (він же лужний) домен. Причому сама модифікація є різноманітною: це не лише фосфорилювання, але також ацетилювання і глікозілювання (що також здійснюється спеціальними ферментами) [2].

Якщо С-кінцевий домен не модифікований, центральний домен не здатний взаємодіяти з ДНК-мішенню. Модифікація ж С-домена не лише надає білку p53 таку здатність, але і впливає на його специфічність. Річ у тому, що p53-залежні енхансери (що відносяться до різних генів) дещо відрізняються послідовністю нуклеотидних пар. І від виду модифікації С-домена залежить, з якими конкретно енхансерами зв'язуватиметься білок p53, а з якими - ні.

Таким чином, за допомогою модифікації двох кінцевих (N- і C-) доменів білок p53 отримує (від дуже численних "джерел") інформацію про стан клітини, переробляє її шляхом зміни своєї конфігурації і належним чином реагує як чинник транскрипції певних генів.

C-кінцевий домен виконує ще одну функцію. Як відмінність вище, деякі гени (BCL2, RELA) білком p53 не активуються, а репресуються. Ця дія, як вважають, здійснюється C-доменом. При цьому останній (замість N-домена) зв'язується з комплексом TFIIID і пригнічує його активність.

Досить важлива функція і інших частин білку p53. Так, в клітині його молекули утворюються один з одним тетрамерні комплекси: це звичайний стан білку незалежно від рівня його активності. За утворення ж комплексів відповідає α -спіральний домен, що є попередником C-кінцевому домену. У мономірному стані білок p53 не здатний до активації. [11].

Між центральним і α -спіральним доменами знаходиться функціонально важлива лінкерна (єднальна) ділянка. Вважають, що він потрібний для проникнення новосинтезованного білку p53 з цитоплазми в ядро.

Нарешті, між N-кінцевим і центральним доменами розташовані ще дві невеликі домени, один з яких багатий на залишок проліну. Обоє вони беруть участь в активації тих або інших мішеней.

Таким чином, структура білку p53 дуже складна, що цілком відповідає його у край важливій функціональній ролі [12].

У клітинах білок p53 постійно синтезується і так же постійно руйнується. Тому в клітинах більшості тканин середня тривалість життя молекул білку і їх стаціонарна концентрація виявляються дуже низькими.

Але при стресах і ушкодженнях клітини швидкість деградації білку p53 сповільнюється, що призводить до збільшення його концентрації. Іншими словами, використовуються два способи включення білку p53 в "роботу":

- підвищення його вмісту (шляхом зниження швидкості розпаду)
- підвищення активності (шляхом модифікації).

Відмітимо: у разі переважної більшості інших білків збільшення концентрації досягається іншим способом - шляхом активації гена і, отже, швидкості синтезу білку. Ген p53, як ми бачимо, досить активно функціонує практично завжди.

Відомі лише одиничні ситуації істотної його активації в порівнянні із звичайним рівнем. Це ранній ембріогенез, а також розвиток ембріональної тератокарціноми [13].

1.2. Функції моноцитів при апоптозі

Моноцити – це фагоцит, що у складі периферичної крові. Діаметр лейкоцитарної клітини становить не більше 18-20 мкм, а в її центрі знаходиться поліморфне ядро, яке відрізняється наявністю пухкої хроматинової мережі.

Особливістю моноцитів є те, що вони так само, як лімфоцити містять несегментоване ядро. Зовні клітина моноциту має бобоподібну форму, яка заповнена великою кількістю цитоплазматичної рідини із високою концентрацією лізосом. У жінок норма найбільшого лейкоциту визначається за результатами розгорнутого дослідження крові з урахуванням віку пацієнтки, а отримані інформаційні дані вносяться до спеціальної таблиці клінічних показників. У людей зі здоровою лімфатичною та кровотворною системою моноцити циркулюють у загальному потоці кровоносного русла протягом 20-40 год, а потім мігрують у м'які тканини, де відбувається їх перетворення на макрофаги. З цього часу вони стають частиною імунної системи організму.

Найбільша концентрація моноцитарних клітин зосереджена у лімфатичних вузлах, а також тканинах печінки, селезінки, легень. Лейкоцити даного типу мають високу рухливість [14].

Функція фагоцитозу полягає в тому, що моноцитарні клітини, які локалізуються в тканинах внутрішніх органів та лімфатичних вузлах, запобігають виникненню запального та інфекційного процесу ще на стадії проникнення мікробів в організм людини. Моноцитарні клітини першими атакують суперечки грибків, бактерії та віруси, які потрапили в кровоносне русло, були занесені разом із потоком повітря або проникли у відкриту рану на шкірній поверхні тіла. Після

нейтралізації патогенних мікроорганізмів моноцити розщеплюють їх шляхом перетравлення, цим поповнюючи власні енергетичні витрати.

Стимуляція реакцій імунної системи. Після того, як найбільші лейкоцити крові першими реагують на інфекційну інвазію, відбувається запуск інших механізмів імунної реакції. Організм спрямовує всі сили на нейтралізацію біологічних агентів. Чим швидше моноцити відреагують на зараження організму бактеріальною, вірусною або грибовою інфекцією, тим швидше загальна імунна система розпочне процес боротьби за стабільну життєдіяльність усіх органів та тканин.

Видалення мутованих клітин. Для людського організму перероджені та мутовані клітини є потенційно небезпечними біологічними агентами. Вони здатні створювати сприятливу основу у розвиток пухлинних процесів. З мутованих клітин можуть утворюватися доброякісні та ракові пухлини, що локалізуються у сполучній, кістковій, епітеліальній та інших видах тканин. Моноцити виявляють, пов'язують і видаляють із організму перероджені клітини ще до того, як вони виявлять свою патогенну активність.

Очищення тканин від патогенних мікроорганізмів та фрагментів клітин. Механічні травми, гострий інфекційно-запальний процес, а також інші ушкодження тканин призводять до того, що в осередку патології зосереджується велика кількість дефектних клітин та бактеріальних мікроорганізмів. Моноцити першими прямують до пошкодженої ділянки шкіри або м'яких тканин, очищають їх від уламків клітин та мають бактерицидну дію. Завдяки цій функції лейкоцитів відбувається швидке відновлення шкірних покривів та регенерація м'яких тканин.

Імунна пам'ять. Моноцити здійснюють накопичення інформаційних даних про патогенні організми, які проникали в кровеносне русло або епітеліальні тканини, виявляли хвороботворну активність і були знешкоджені в результаті імунної відповіді. Наступні покоління клітин моноцитарної групи вже знають, як діяти проти конкретного штаму інфекційних мікроорганізмів, що суттєво підвищує захисну функцію імунної системи.

Синтез цитокінів. У людському організмі цитокіни виконують роль інформаційних молекул, що належать до пептидного типу. Вони беруть активну участь у мобілізації захисних механізмів імунної системи у відповідь на наростаючий запальний процес. Цитокіни є фізіологічними регуляторами гуморального та клітинного імунітету. Також вони мають власну функціональну активність, надаючи протівірусний і цитотоксичний захист людського організму [15].

Раніше вчені гематологи вважали, що фагоцити цього типу утворюються в ретикулоендотеліальній системі. Останні наукові дослідження показали, що синтез моноцитів відбувається у тканинах кісткового мозку. У кровоносне русло викидаються вже зрілі лейкоцити, які мають найпотужніші фагоцитарні властивості. Дозрівання клітин здійснюється протягом наступних 5 діб, а потім вони стають частиною периферичної крові. Процес синтезу моноцитів гальмується в період прийому препаратів із групи глюкокортикоїдів, а також у тому випадку, якщо людина тривалий час перебуває в умовах постійного стресу. У зв'язку з цим відбувається зниження імунітету, а організм людини стає більш схильним до зараження інфекційними, вірусними та грибовими мікроорганізмами [16].

1.3 Індуктори та інгібітори апоптозу

Індукторний сигнал, що викликає апоптоз, фактично є його причиною.

Індукція апоптозу може відбуватися при дії як зовнішніх, так і внутрішніх факторів за двома напрямками:

- * через викликане індукторами апоптозу зростання входу кальцію всередину клітини;

- * через підвищення експресії або розвитку мутації генів активаторів апоптозу під впливом індуктора. Унаслідок підвищення експресії цих генів (тобто активації процесів біосинтезу білків, які ними кодуються) у клітинах, що підлягають апоптозу, синтезуються специфічні білки:

- цистеїнові протеази* (каспази). Представники – кальпаїни, які необхідні для розщеплення білків цитоскелета, мембранних рецепторів.

-серинові протеази. Представник – грамзин В/фрагментин, що є компонентом цитоплазматичних гранул, які секретуються цитотоксичними лімфоцитами. У тих же гранулах міститься преутворювальний білок перфорин, який сприяє проникненню даних протеаз у клітини [17].

Найчастіше зовнішня активація апоптозу відбувається в результаті розвитку *ексайтотоксичності* ("збуджувальної токсичності" або "смерті від надмірного збудження" – локальної загибелі нервових клітин від токсичної дії збуджувального нейромедіатора глутамату). У цьому явищі першочергову роль відіграє іонотропний* NMDA-рецептор – високоспецифічний лігандзалежний Ca^{2+} -канал нейронів, що належить до родини іонотропних* глутаматних рецепторів.

Є два типи регуляції діяльності іонних каналів: іонотропний та метаботропний. При іонотропній регуляції рецептор і канал є єдиною макромолекулою – у цьому випадку і говорять про іонотропний рецептор. Якщо до такого рецептора приєднується медіатор, то конформація всієї макромолекули змінюється таким чином, що в центрі каналу утворюється пора, і крізь неї проходять іони.

При метаботропному варіанті регуляції рецептори напряму не зв'язані з каналом; приєднання медіатора та відкриття каналу при цьому розділені кількома проміжними етапами (зокрема, за участю G-білків такого як p53 і вторинних месенджерів).

Надмірна стимуляція NMDA-рецептора спричиняє надмірний вхід Ca^{2+} у клітину з наступною генерацією вільних радикалів (NO, ROS), руйнуванням потенціалу внутрішньої мітохондріальної мембрани, стимуляцією Ca^{2+} -залежних протеаз, утратою АТФ, що реалізуються в апоптозі чи некрозі нейронів (залежно від розмірів ушкодження і швидкості поповнення пулу АТФ). Саме ці процеси і є проявами "збуджувальної токсичності" і включаються в патогенез уражень мозку при ішемії, церебральних дегенераціях, а також, можливо, у патогенез вірусних і пріонових енцефалітів. При вірусних енцефалітах можлива і пряма індукція апоптозу вірусними протеїнами [18].

Ацетат Рb з кісткового мозку моноцити проникають у кровоносне русло, де затримуються на 2-3 дні. Через зазначений термін клітини або гинуть шляхом традиційного апоптозу (запрограмованої природою загибелі клітин), або переходять на новий рівень – перетворюються на макрофаги. Удосконалені клітини виходять із кровоносного русла та потрапляють у тканини, де й залишаються протягом 1-2 місяців [19].

1.4. Загальна характеристика СА-15-3 і р53.

Злоякісне переродження тканин призводить до порушення будови органу, і глікопротеїди потрапляють в кров. Відомо досить багато глікопротеїдів муцинозної групи: СА 15-3, СМА, СА 549, СА 27.29, ВСМ, ЕМСА, М26 і М2918. Серед цих антигенів найбільш широко використовуються в діагностиці раку молочної залози СА-15-3. У здоровій молочної залозі ці речовини виділяються в молочні протоки і потрапляють в грудне молоко. СА 15-3 відноситься до високомолекулярних глікопротеїнів типу муцину з молекулярною масою 300 000. Він не є строго специфічним для даного виду карциноми, тому використовувати його для скринінгу та діагностики раку молочної залози не рекомендується: тільки у 20% жінок, у яких діагностовано I-II стадію раку молочної залози, спостерігається збільшення СА15-3 в крові. СА15-3 (carcinomaantigen 15-3) – глікопротеїн, показники якого можуть змінюватися при лікуванні злоякісної пухлини молочної залози. На нього звертають увагу, коли оцінюють ефективність терапії в динаміці. Показники глікогену в організмі хворого також дозволяють лікарям провести якісну диференційну діагностику – відрізнити онкологію від мастопатії. Як скринінговий тест, цей пухлинний маркер використовується рідко. При інтерпретації отриманих результатів враховуються: індивідуальні особливості кожного пацієнта; вид раку; поширеність пухлини. СА 15-3 – це самий чутливий білок з сімейства MUC-1. Він в 20% випадків підвищується у хворих на 1-2 стадії раку і в 80% випадків на 3-4. Цей аналіз проводять в комплексі з СЕАСАМ5 (раково-ембріональним антигеном), щоб точніше виявити РМЗ на початку розвитку. Якщо концентрація білка СА 15-3 в біологічному матеріалі стрімко зростає, то це свідчить про: зростання пухлини в розмірах; прогресивної форми

ракового захворювання, при якому прогноз виживання низький; метастазуванні пухлини. Якщо СА 15-3 знижується, то запропонована лікарем терапія дає результати. Збереження результату на колишньому рівні – сигнал, що треба щось міняти схему лікування, тому що у хворого зник ефект від медикаментів. Допустимі значення онкомаркера СА15-3 у дорослої людини не перевищують 30 МО / мл [20].

Виникнення будь-якої злоякісної пухлини пов'язано з порушенням механізмів апоптозу (запрограмованої загибелі клітин), які контролюються білком p53. Його нормальне функціонування перешкоджає безконтрольному поділу дефектних клітин. Якщо в результаті будь-якого впливу (опромінення, хімічних речовин) в клітці відбувається пошкодження молекули ДНК, білок P53 припинить свій поділ до тих пір, поки пошкодження не буде відновлено, або активує свою запрограмовану смерть, перш ніж він встигне розділитися. Цей механізм працює до тих пір, поки ген TP53 має нормальну будову. Коли в ньому відбуваються мутації, в клітині накопичується білок-мутант, який не може виконувати свою основну функцію. При цьому порушуються механізми включення апоптозу в моноцитах, який проявляється розвитком новоутворень, а якщо вони є, то сприяє виникненню стійкості пухлинних клітин до хіміотерапії [21].

1.5. Маркери сироватки крові при раку молочної залози.

В діагностиці РМЗ показові три основних види онкологічних маркерів:

- сироваткові, клітинні;
- тканинні;
- генетичні.

Сироваткові онкомаркери речовини білково-вуглеводної будови, які знаходяться в кровоносній руслі. Їх виявляють, коли проводять реакцію біологічного матеріалу пацієнта зі специфічними антитілами. Цей тип маркерів володіє найбільшою популярністю в клінічній практиці, оскільки він найбільш точно відображають особливості, ступінь, поширеність і швидкість розвитку хвороби. Типи сироваткових онкомаркерів:

онкомаркер білкової P53;

CEACAM5 (PEA);

муцинового глікопротеїди, до яких відносять CA15-3, CA27.29, CA 549;

тканинні поліпептидні антигени (TPA, TPS).

Тканинні поліпептидні антигени TPA, TPS і UBC (Urinary Bladder Cancer)

Значущими для діагностики РМЗ є три цитокератина:

(CYK8 / 18);

TPS (CYK18);

UBC (Urinary Bladder Cancer).

TPAcyk (CYK8 / 18) утворюється при некрозі клітин пухлини і в циклах нормального клітинного обміну. За показником TPAcyk судять, наскільки швидко відновлюються пошкоджені клітини після лікування [22, 23].

Генетичні онкомаркери BRCA1, BRCA2 mso-fareast-font-family: Arial score = 0> Мутаційні зміни, тісно пов'язані з РМЗ, виявляються в генах BRCA1 і BRCA2. Ген BRCA1 кодує однойменний білок, який бере участь у відновленні молекули ДНК, підтримує генетичну стабільність і регулює клітинний цикл. У науковій літературі зустрічається більше 500 описів мутаційних змін гена BRCA1, асоційованих з подальшим розвитком раку молочних залоз у жінок і раком простати у чоловіків. У жінок, які є носіями гена BRCA1, ймовірність розвитку РМЗ становить від 50 до 85%. Крім цього, мутації можуть бути пов'язані з розвитком пухлин іншої локалізації (наприклад, травна система). Ген BRCA 1, 2 дозволяє виявляти спадкову схильність до розвитку раку молочних залоз. Приблизно 5% жінок успадкують гени, відповідальні за появу раку від своїх батьків. Розшифровка результату аналізу на BRCA1 / BRCA2 виглядає наступним чином: N / N – існує низька ймовірність розвитку раку, вона дорівнює популяційному значенням, N / ins – висока ймовірність розвитку пухлини [24,25].

1.6. Користь від комбінації маркерів PEA, CA15-3, p 53

Діагностична цінність СА 15-3 та p 53 підвищується в поєднанні з визначенням раково-ембріонального антигену (PEA). Існує пряма кореляція зі стадією пухлини, наявністю метастазів: рівень буде вище при наявності злоякісного процесу в кістках, печінці і легенях: до 80% жінок з метастазами раку

молочної залози мають значне підвищення рівня СА 15-3 онкомаркера. Рівень СА 15-3 підвищується за 3-14 місяців до появи клініко-рентгенографічних ознак рецидиву, метастазування, що необхідно враховувати при інтерпретації результатів при моніторингу після лікування. При раку молочної залози він досить добре корелює з ефективністю лікування (у 66% спостерігається зниження), але не може бути лише єдиним маркером як ефективності терапії, так і метастазування. Зниження в сироватці крові СА 15-3 та p53 є показником відповіді на проведену терапію, при цьому збереження концентрації, пов'язане з прогресуванням захворювання і неадекватною відповіддю на лікування. Білок глікопротеїн, що має вуглеводну основу структури і є вуглеводним антигеном СА 15-3. Приблизна маса цього з'єднання - 300 тисяч Дальтон. Виявляється такий антиген, як правило, на поверхні епітеліальних клітин молочних протоків [26, 27].

1.7. Особливості скринінгу раку молочної залози

Недоліком методу є невисока чутливість. Крім раку молочної залози, підвищення онкомаркерів може свідчити про інші патології:

Підвищення СА 15-3 – при онкології шийки матки і ендометрія, яєчників, підшлункової залози, легень, печінки, товстої кишки, підшлункової залози. Відхилення від норми в більшу сторону СА 27.29 – при кісті яєчника, ендометріозі, доброякісних утвореннях нирок, печінки, молочних залоз і в першому триместрі вагітності.

Надлишок PEA – при порушеннях шлунково-кишкового тракту, молочних залози, дисфункції легень або печінки.

Збільшення HER2 – при злоякісних захворюваннях шлунка, молочних залози, яєчників, матки.

Мутація p53 є найпоширенішим генетичним дефектом раку багатьох місць і зустрічається приблизно в 20% «спорадичних» випадків і в половині сімейних випадків раку молочної залози [28].

На сьогоднішній день існує кілька основних методів виявлення наявності пошкоджень ДНК в гені TP53:

Секвенування. В результаті аналізу розшифровується послідовність всього гена, що дозволяє знайти всі мутації, які в ньому існують. Вони можуть виникати як в нормальних клітинах, підвищуючи ймовірність злоякісного переродження, так і в пухлинних, що зумовлює подальше прогресування новоутворення. Цей метод використовується при підозрі на спадкові синдроми, коли мутації в гені є ініціюючою подією. В інших випадках виникають значні труднощі з інтерпретацією виявленого пошкодження ДНК.

Імуногістохімічний аналіз (ІГХ). Цей метод дослідження є основним в клінічній практиці. Він дозволяє оцінити експресію в досліджуваній тканині білка p53, підвищення концентрації якого свідчить про порушення в роботі відповідного гена і, як правило, пов'язане з високою проліферативною активністю клітин (що дозволяє диференціювати дисплазію і злоякісні пухлини) і найчастіше є ознакою несприятливого прогнозу. Для виконання ІГХ на першому етапі проводиться біопсія. Потім отриману тканину фіксують на склянці, додають в неї специфічні антитіла, марковані барвником. Результати можна оцінити за допомогою звичайного світлового мікроскопа. Таким чином, за кількістю зв'язаного барвника в тканині можна візуально оцінити вміст білка. Рейтингова система двовимірна:

Інтенсивність забарвлення оцінюється від 0 до 3 балів. При цьому 0 балів - відсутня забарвлення, а 3 - сильне фарбування.

Оцінюється частка забарвлених осередків, які в залежності від числового значення перетворюються в точки.

Метод ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції) для знаходження пошкодження ДНК в гені TP53 дещо застарів. В даний час його використовують дуже рідко, коли необхідно підтвердити наявність або відсутність конкретної мутації до прикладу синдром Лі-Фраумені. Однак, в силу їх великої різноманітності, в даний час перевага віддається секвенуванню цілого геному.

На закінчення відзначимо, що оскільки організм являє собою складну систему, мутації в одному гені тільки підвищують ймовірність, але не гарантують розвитку пухлини в організмі. Тому будь-яке дослідження, яке показало те чи інше

порушення в роботі гена TP53, має інтерпретуватися лікарем в комплексі з урахуванням клінічної картини і використовуваного методу [29].

1.8. Класифікація раку молочної залози.

TNM Classification of Malignant Tumours (остання 7-я редакція, 2009 рік) стосується ракових пухлин будь-якої локалізації, і, таким чином, це і є класифікація стадій раку молочної залози. Вона систематизує основні симптоми раку: T - Tumor (пухлина), N - Nodus (вузли, тобто ураження лімфовузлів) і M - Metastasis (метастази). Залежно від ступеня їх прояву визначає стадії розвитку захворювання. Позначення Tis (Tumor in situ) застосовується в разі наявності компактної пухлини, яка не впливає на інші, розташовані в безпосередній близькості тканини. Позначення T1-T4 відносяться до визначення розміру злякисного новоутворення, а також рівню ураження тканин і органів, розташованих поруч з пухлиною. Це стадії раку молочної залози 1, 2, 3 і 4.

Крім того, якщо патологічний процес не торкнувся регіонарні лімфатичні вузли, застосовується позначення N0. Ураження лімфовузлів - їх розміри, загальна кількість і локалізація - позначаються N1-N3. А процес метастазування раку має такі градації: Mx (виявити метастази неможливо), M0 (віддалені метастази відсутні) і M1 (віддалені метастази є).

Відповідно, 0 стадія раку молочної залози є зовсім невелику пухлину, яка не встигла вразити інші тканини і торкнутися лімфатичні вузли.

Якщо діагностується 1 стадія раку молочної залози, то це означає, що розмір пухлини не перевищує 2 см в діаметрі, а її клітини вже проникли в навколишні тканини, тобто йде процес пухлинної інвазії. Але при цьому лімфатичні вузли не порушені.

2 стадія раку молочної залози характеризується збільшенням неоплазії до 5 см і початком її поширення на клітини гіподерми - нижнього (жирового) шару шкіри. Ця стадія має варіанти - 2A і 2B. При 2A метастази відсутні, а при 2B в області пахв з боку пухлини виявляються поодинокі метастази, не з'єднані ні між собою, ні з сусідніми тканинами. Виходячи їх клінічної картини онкопатології, 0, 1

і 2А - це ранні стадії раку молочної залози. 2В, 3 - пізніші, а 4 вважається пізньою стадією даного захворювання.

3 стадія раку молочної залози також має дві «підстадії» - 3А і 3В. У разі 3А поперечний розмір пухлини становить більше 5 см, відзначається наявність декількох метастазів (в пахову область) і збільшення лімфовузлів, які спаяні один з одним або прилеглими тканинами. Сосок може втягнути, з нього можуть бути серозні або кров'яністі виділення. На стадії 3В пухлина стає ще більше, при цьому можуть бути вражені внутрішньо грудні лімфовузли і стінка грудної клітини. Онкологи відрізняють так звану запальну форму раку молочної залози, яка розвивається дуже швидко і нерідко «маскується» під мастит. Характерні ознаки такого раку - видозміна шкіри на грудях, її гіперемія і гіпертермія.

4 стадія раку молочної залози визначається, коли ураження охоплює всю залозу, а також всі лімфатичні вузли (пахвові, внутрішньо грудні, підключичні і більш віддалені). Шкіра та підшкірні тканини грудей покриваються виразками, а метастази пухлини, поширені лімфовідтоком, можуть виявлятися в легких, надниркових залозах, печінці, кісткових тканинах і навіть в головному мозку [30].

G – Гістологічна градація:

- 1 GX – Ступінь диференціювання не може бути встановлений
- 2 G1- Високий ступінь диференціювання.
- 3 G2- Середній ступінь диференціювання.
- 4 G3-Низький ступінь диференціювання.
- 5 G4- Недиференційовані пухлини [31].

РОЗДІЛ 2.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Матеріали дослідження. Загальна характеристика досліджуваних груп жінок.

Ретроспективно проаналізовано 58 медичних карт хворих на РМЗ (віком від 42 до 68 років) у стадії T2-3N1-2M0, які отримали лікування у багатопрофільному медичному центрі "Юліс" з 2019-2021 рік. Усі пухлини морфологічно (гістологічно після трепан біопсії) верифіковані до початку лікування (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Загальна характеристика досліджуваних груп

Гістологічний тип РМЗ	Кількість хворих	
	n	%
часточковий інфільтруючий	9	15,5
протоковий інфільтруючий	49	84,5

Усі хворі отримали передопераційний чотири курса хіміотерапії за схемою АС (доксорубіцин 60 мг/м²+ циклофосфан 600 мг/ м²). Імуногістохімічно у 4 (7,1%) хворих встановлено тричі негативній підтип РМЗ, у 6 (10,2%) інших хворих був HER2-neu позитивний підтип, в інших випадках-48(82,7%) був гормон позитивний(ER/PR+).

Експресію мутантного білка p53 в пухлини визначали імуногістологічним методом (клон DO-7). Результати реакції з антигенами, що мають ядерну локалізацію, оцінювали за системою підрахунку histochemical score. Система підрахунку включає інтенсивність забарвлення за 3-х бальною шкалою і частку забарвлених клітин і є сумою добутку відсотків, що відображають частку клітин з різною інтенсивністю забарвлення, на бал, що відповідає інтенсивності реакції. Позитивний результат відзначали при фарбуванні ядер пухлинних клітин більше 10%(+), помірне фарбування ядер до 50%(++) та інтенсивне фарбування ядер клітин більше 50%(+++).

У нашому аналізі була відзначена пряма кореляційна залежність між експресією p53 у клітинах пухлини та моноцитоз, що підтверджується літературними даними.

При онкологічних захворюваннях, зокрема при раку молочної залози спостерігається моноцитоз – збільшення кількості моноцитів. Моноцити або макрофаги відповідають на вплив різноманітних агоністів, швидко гідролізуючи мембранні фосфоліпіди, що призводить до генерації великої кількості внутрішньоклітинних та екстраклітинних месенджерів, внаслідок чого реалізується багатофункціональний потенціал цих клітин. Однак при підході до пухлини моноцити або макрофаги втрачають свою рухливість, а також можливість передавати інформацію про виявлену пухлину іншим імунокомпетентним клітинам. У той же час дотепер ряд питань щодо поведінки моноцитів вивчено недостатньо. Зокрема, показано, що в моноцитах посилюється ліпідний метаболізм, інтенсифікуються процеси пероксидації ліпідів.

Статистична обробка отриманих даних проведена з використанням коефіцієнта кореляції, методу Каплана-Майєра, програми Microsoft Office Excel.

2.2 Методи дослідження

Завдяки широкому впровадженню в патологоанатомічну практику поглибити діагностику захворювання та індивідуалізувати методи лікування хворих гістохімічного методу дослідження з'явилася можливість на РМЗ.

Для вирішення поставлених у магістерській роботі завдань, були використані імунологічні (дослідження сироваткових маркерів), патогістологічні, методи пов'язані з комп'ютерною томографією та статистичні методи дослідження.

Імуногістохімічні маркери, що відбивають фундаментальні біологічні властивості та функціональний стан пухлинних клітин, відіграють важливу роль в оцінці особливостей перебігу та результату онкологічних захворювань. Проте через велику кількість потенціально значущих молекулярно-біологічних факторів і суттєвих розбіжностей представлених у літературі даних про їхню прогностичну цінність вибір певного типу терапії, заснований на біологічних характеристиках пухлини, залишається скрутним і невизначеним для лікаря.

Одним із таких маркерів є білок p53 . Мутація p53 є найбільш поширеним генетичним дефектом при раку багатьох локалізацій і виникає приблизно в 20% «спорадичних» випадків і в половині випадків сімейного РМЗ. Лабораторними дослідженнями встановлено, що клітини з мутацією білка p53 стійкі до дії випромінювання та хіміотерапевтичних препаратів, які зазвичай викликають апоптоз. Є повідомлення про негативний вплив мутантного білка p53 на безрецидивну та загальну виживання хворих на РМЗ . Однак питання зв'язку експресії мутантного p53 з динамікою пухлинного прогресування на ранніх стадіях захворювання, зокрема з розвитком метастазів РМЗ у регіонарних лімфатичних вузлах (РЛУ), досліджено недостатньо.

Фіксацію операційного матеріалу здійснювали з використанням нейтрального 10% самбуферного формаліну. Зрізи товщиною 4-5 мкм наносили на скла, оброблені клейкою рідиною. Демаскування антигенів виконувалося нагріванням секцій в цитратному буфері (рН = 6,0) автоклавуванням протягом 10 хв при досягненні температури в буфері на рівні 121 ° С при тиску 1 атм. Подальша процедура проводилася відповідно до технології і вимог специфікацій виробника МкАТ (p53, клон DO-7, «ДАКО», Данія).

2.2.1 Імунологічний метод.

Імунологічні методи дозволяють за допомогою специфічних антитіл до білків-маркерів апоптозу (напр., Fas-R-, Fas-L, білки родини Bcl-2, каспази, сюрвівін) або до продуктів ферментативного розщеплення, що утворюються при реалізації апоптозної програми, виявляти апоптозні клітини.

Найпоширенішим методом цієї групи є імуноблоттінг (або Western Blotting). Його перевага полягає у можливості використання для аналізу як культури клітин, так і зразків тканин та біологічних рідин, що сприяє застосуванню цього методу для діагностики та визначення ефективності терапії розладів, пов'язаних із порушенням реалізації апоптозної загибелі, зокрема, протипухлинної терапії. Суть методу полягає у перенесенні білків із гелю на нітроцелюлозну мембрану-носій та у подальшій їх взаємодії зі специфічними антитілами, які візуалізують через кольорову реакцію, хемілюмінісценцію чи радіоактивні ізотопи. Інші методи, що

використовуються для виявлення апоптозних клітин – спектрофотометрія, магнітно-резонансна та інфрачервона спектроскопії – реєструють зміни біохімічних та біофізичних властивостей, які відбуваються в апоптозних клітинах.

Визначення проводили на аналізаторі IMMULATE 2000. Принцип імуноферментного аналізу полягає в виявленні антигенів за допомогою відповідних їм антитіл, кон'югованих з ферментом-міткою.

Проведення аналізу на визначення p53: Проба та реагент автоматично вносяться в реакційну пробірку, що містить мічену кульку. В ході імунологічної реакції антитіла та антигени зв'язують на кульки. Міткою є лужна фосфатаза. Кількість зв'язаних на кульки лужної фосфатази прямо пропорційна кількості визначеної речовини. Після інкубації в інкубаційному камері реакційна пробірка доставляється в вузол промивання, потім пробірка обертається навколо поздовжньої осі зі швидкістю 8500 обертів за хвилину. Вміст пробірки при цьому відсмоктується в спеціальну камеру і далі заливається в контейнер для рідких відходів, при такій промивці ефективно видаляється практично весь незв'язаний реакційний матеріал. Додається вода і пробірка обертається для видалення незв'язаного кон'югата. Процедура промивання повторюється в цілому чотири рази. Результатом промивання є зведення неспецифічного зв'язування до мінімуму. Основні моменти в проведенні аналізу на визначення білка p53 відображається в таблиці 2.2.1.1.

Таблиця 2.2.1.1.

Проведення аналізу на визначення p53.

Метод дослідження	ІФА
Правила підготовки	Загально клінічні та біохімічні аналізи
Матеріал для дослідження	Венозна кров
Транспортне середовище	Вакутейнер з/без антикоагулянту з/без гелевої фази
Індекс	Ознака
Аналізатор і тест-система	Фотометр Фа. Текан; Фа. Діанова
Референтні значення, Ед/мл	До 60,0

Основні моменти в проведенні аналізу на визначення онкомаркера СА 15-3 відображаються в таблиці 2.2.1.2.

Таблиця 2.2.1.2

Проведення аналізу на визначення антигена СА 15–3

Метод дослідження	Еклія
Правила підготовки	Загально клінічні та біохімічні аналізи крові
Матеріал для дослідження	Венозна кров
Транспортне середовище	Вакутейнер з/без антикоагулянеу з/без гелевої фази
Коефіцієнт конверсії	У/мл = кУ/л
Аналізатор і тест-система	Cobas 6000, Roche Diagnostics (Швейцарія)
Референтні значення, Ед/мл	До 25.0

2.2.2 Патогістологічний метод.

Дослідження біопсійного та операційного матеріалів дозволяє судити про радикальність операції, динаміку патологічного процесу, про зміни, що виникли в тканинах чи новоутвореннях під впливом лікування. Медичний центр «Юліс» біопсійний матеріал робить на місці.

Етапи отримання гістологічного препарату:

1. отримання біологічного матеріалу методом біопсії/операційної резекції хірургом під час виконання оперативного втручання (діагностична лапаротомія, вторинна редукція);

Види біопсії: 1 - пункційна (аспіраційна) біопсія -цітолітичне дослідження, 2 - трепан-біопсія, 3 - інцизійна біопсія, 4 - ексцизійна (тотальна) біопсія - гістологічне дослідження.

2. розміщення біологічного матеріалу у фіксуєчий розчин формаліну при витримці у середньому 24-48 годин;

3. проведення вирізки матеріалу для подальшого його дослідження;
4. проводка шматочків матеріалу у розчинах спиртів, підготовка до заливки його у парафінові блоки (проводять поступову дегідратацію у розчинах етилового спирту зростаючої концентрації: від 50°C до 96°C та 100°C, за можливості);
5. виготовлення парафінових блоків (використовують гістоцентри для заливки зразків тканини у парафін);
6. отримання гістологічних зрізів (для цього використовують ротаційні мікротоми);
7. фарбування зрізів та завершення виготовлення гістологічного препарату (зазвичай для фарбування використовують гематоксилін та еозин, після чого останнім етапом є нанесення гістологічного бальзаму на зріз тканини).

Матеріал для цитологічного дослідження отримували з розрізу видаленого новоутворення шляхом зіскрібку матеріалу по всій поверхні пухлинного вузла (або найбільш підозрілих ділянок, за відсутності чітко вираженого вузла пухлини). Зіскріб поміщали у спеціальне транспортне середовище, що складається з альбуміну, поліглюкіну та розчину Хенкса, далі матеріал обробляли за допомогою центрифуги Shandon Cytospin 4 (Thermo, США). У процесі центрифугування клітини рівномірно розподілилися на оброблених ділянках скла.

За будь-яких обставин готували та фарбували один препарат рутинною методикою (гематокселинеозином) для морфологічної оцінки та підрахунку кількості клітин. Якщо клітин було достатньо (не менше 300), то готували ще 5 препаратів (4 препарати для ІЦХ реакцій та 1 для негативного контролю). Мазки підсушували на повітрі, фіксували 96% спиртом протягом 10 хвилин.

Для проведення імуногістохімічного дослідження парафінових блоків готували зрізи товщиною 4-5 мкм, які поміщали на скло, попередньо оброблені полі-L-лізином. Потім матеріал досліджували за загальноприйнятою стандартною методикою з використанням наступних антитіл: ER – клон 1D5, PgR – клон 636, Her2/neu – клон CB11. Фіксацію матеріалу здійснювали з використанням нейтрального 10% забуферованого формаліну. Зрізи завтовшки 4-5 мкм наносили на скло, оброблені адгезивною рідиною.

Демаскування антигенів проводили нагріванням зрізів у цитратному буфері рН=6,0 при автоклавуванні 10 хв при досягненні в буфері температури 121°З тиску 1 атм.т. У подальшу процедуру проводили відповідно до технології та вимог специфікації. Після видалення первинних МКАТ застосовували систему візуалізації LSAB2 (біотиніловані антитіла та пероксидазний комплекс), а як хромоген використовували DAB (3,3'-діамінобензидин). Після проведення імуногістохімічної реакції зрізи докрашували гематоксиліном Мейєра.

Після проведення імуногістохімічних реакцій зрізи додатково фарбували гематоксиліном Майєра. Антигенні детермінанти p53 розташовуються інтрануклеарно, тому позитивними вважали лише клітини, в яких отримано інтенсивні ядерні реакції. Були використані рекомендації американської науково-дослідної лабораторії (ARUP), згідно з якими інтенсивність фарбування ядер оцінюється (аналогічно стероїдним рецепторам) за 3 ступенями.

Позитивний результат відзначали при фарбуванні ядер 10% пухлинних клітин, слабе фарбування ядр (+) – 10-30%, (++) – 31-50%, (+++) → 50%. Усі пацієнтки отримали комбіноване або комплексне лікування за показаннями відповідно до існуючих стандартів діагностики та лікування хворих на онкологічний профіль, затвердженого наказом Міністерства охорони здоров'я України «Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю «Онкологія» від 17.09.2007 р. № 554. Статистична обробка даних виконана з використанням коефіцієнта кореляції за Пірсоном, програми Microsoft Office Excel 2010, Statistica 6.0, SPSS

2.2.3. Комп'ютерна томографія

КТ - метод променевої діагностики, що заснований на застосуванні рентгенівських променів. В онкології широко використовують систему RECIST 1.1.

RECIST 1.1 (response evaluation criteria in solid tumours) – система, яка дозволяє об'єктивно оцінювати розповсюдженість пухлини та момент початку лікування та після лікування, тобто оцінити ефективність проведеної терапії.

Чотири основних етапи оцінки відповіді пухлини на лікування за критеріями RECIST 1.1:

1. Виявлення всіх видимих осередків;

2. Ідентифікація та коректний вибір вимірюваних та невимірюваних осередків (вимірювані осередки це утворення найбільшого діаметру, яке на КТ складає більше 10 мм, при рентгенологічному дослідженні 20 мм, або якщо це лімфатичні вузли то діаметр його складає більше 15 мм; не вимірювані осередки це утворення які менші ніж 10 мм в діаметрі, або якщо це лімфатичні вузли то діаметр його складає більше 10 але менше 14 мм);

3. Адекватна оцінка розмірів тангентних та нетангентних вогнищ після отриманого лікування (цільові осередки мають тільки кількісну характеристику, не цільові тільки якісну).

П'ять правил вибору тангентного осередку:

1-не більше 5 осередків можуть бути вибрані в якості цільового осередку;

2-не більше 2 осередків в одному органі;

3-обирати тільки ті осередки, які можуть бути відтворені на наступному огляді (чіткі межі, без асиметрії, прості форми, розмір та місце розташування, яке не зникне з часом);

4-потрібно обирати найбільші осередки в діаметрі;

5-потрібно намагатися обирати осередки, які знаходяться в декількох анатомічних областях організму.

Оцінка не тангентних осередків:

- не цільові осередки підраховуються та характеризуються від візиту до візиту так: зникли, залишаються без змін, стали більшими;

- при наявності множинних осередків в одному органі вони можуть бути записані, як «множинні осередки».

2.2.4 УЗД Ультразвукове дослідження лімфовузлів

Ультразвукове сканування в діагностиці раку молочної залози
Ультразвукова томографія на сьогоднішній день є головним неінвазивним методом діагностики рідинних об'ємних утворень молочної залози. У зв'язку з відсутністю

променевого навантаження він може використовуватися багаторазово, в будь-якій віковій групі, в період вагітності і лактації. Ехографічний скринінг сприяє виявленню не тільки патології різних органів і систем, але і проведення диференціальної діагностики злоякісних новоутворень на субклінічних стадіях, що дозволяє вибрати адекватний обсяг хірургічного втручання. Поліморфізм ультразвукової картини РМЗ може бути обумовлений його морфологічним субстратом. З урахуванням гістологічних особливостей росту були виділені 3 характерних варіанти ультразвукового зображення вузлової форми пухлини:

1) скірозна форма - пухлина з нечіткими нерівними зірчастими контурами, неоднорідної внутрішньої ехоструктури з переважанням безладних відображень зниженою інтенсивності;

2) медулярна форма - пухлина з чіткими рівними контурами, зниженої ехогенності і помірно гетерогенної внутрішньою структурою;

3) порожнинна (папілярна) форма - пухлина з чіткими, рівними контурами округлої форми, ехонегативних, з солідним внутрішнім компонентом, однорідної або неоднорідної структури. Слід зазначити, що ультразвук успішно виявляє лімфатичні вузли або вузлові утворення в «сліпих зонах» молочної залози - над- і підключичних, ретромаммарної, в області субмаммарної складки і пахвовій западини. Чутливість методу досягає 80%. Загальновідома роль ультразвукового методу у виявленні метастазів раку молочної залози в печінку. Чутливість УЗД у виявленні РМЗ склала 88,3%, специфічність - 96,4%, чутливість методу складає 94 - 100%, специфічність - до 97,3%. Мінімальні розміри кісти, які виявляються при УЗД - 2 мм.

2.2.5. Статистичні методи дослідження.

Статистична обробка даних наукових досліджень проводилась з використанням пакету програм «STATISTICA 6.0 for Windows 10.0» (StatSoftInc., NoAXXR712D833214FAN5), а також «Microsoft Office Excell 2007» для підготовки даних. Описова статистика включала розрахунки розмаху значень, значень медіани (Me), нижнього та верхнього кватилів, за необхідності розраховували 95 % довірчий інтервал оцінки середнього (95 % ДІ). Кватилі є значенням ознаки, що

ділять упорядковану за зростанням сукупність на чотири рівні за кількістю елементів частини.

Медіана - значення ознаки, яке поділяє весь ряд значень за зростанням навпіл, тобто половина значень ознаки менша за медіану, і половина - більша за неї.

Для вирішення поставлених задач використовувались непараметричні методи, тому що наші данні не підпорядковуються розподілу Гауса (нормальному розподілу):

1. U-критерій Манна - Уїтні (використовується для оцінки розходжень між двома незалежними вибірками). Найбільш потужна (чутлива) непараметрична альтернатива t-критерію для незалежних вибірок.

Розрахунок значення U-критерію Манна - Уїтні проводиться за допомогою наступної формули:

$$U = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_x \cdot (n_x + 1)}{2} - T_x$$

Де n_1 - кількість елементів у першій вибірці, n_2 - кількість елементів у другій вибірці, n_x - кількість елементів у великій вибірці, T_x - сума рангів у великій вибірці.

Проводили порівняння середніх значень (X_1, X_2) показників маркерів:

($X_1 \neq X_2$) - статистично значима різниця - показники, які не належать до однієї генеральної сукупності;

($X_1 = X_2$) - статистично не значима різниця - показники, які належать до однієї генеральної сукупності.

2.3. Оцінка прогностичної ролі маркерів

2.3.1. Визначення методом Каплана - Мейера аналізу виживаності.

Метод Каплана-Мейера, графічне уявлення методу полягає у побудові кривої дожиття, що відображає пропорцію пацієнтів, у яких очікувана подія не відбулася до певного моменту часу. Тимчасові інтервали визначаються періодичністю контрольних обстежень або часом до події в реальному масштабі (якщо відомий момент походження події). Коли у об'єкта спостереження відбувається очікувана подія, проводиться перерахунок пропорції об'єктів, що залишилися в дослідженні, у яких подія не відбулася, що відображається «сходінкою» вниз на кривій.

Головне завдання полягає в тому, щоб оцінити функцію дожиття, тобто ймовірність того, що пацієнт проживе певний час після операції. Оцінка функції дожиття проводиться по формулі:

$$S(t) = \prod_{j=1}^{t-1} [(n-j)/(n-j+1)]^{\delta(j)}$$

Де $S(t)$ - оцінка функції дожиття, n - загальне число подій, j - порядковий (хронологічний) номер окремої події, $d(j)=1$, якщо j -оє подія означає смерть та $\delta(j)=0$, якщо j -оє подія означає втрату спостереження (цензуровані).

Π - означає виконання за усіма спостереженнями j , які завершилися до моменту t .

Використовували довірчий інтервал (confidence interval)- діапазон значень, що визначається шляхом використання даних, що спостерігаються, для інтервальної оцінки статистичних параметрів.

2.3.2. Порівняння функцій виживаності для III та IV стадії за допомогою «Logrank test»

Log-ranktest- логарифмічний ранговий критерій. Використовується для порівняння двох кривих дожиття.

При визначенні різниці між двома функціями дожиття використовували статистичну значущість (p), якщо:

$p < 0,05$ - статистично значима різниця;

$p > 0,05$ - статистично не значима різниця.

2.3.3 Визначення впливу експресії маркерів на функцію виживаності за допомогою пропорційної моделі Кокса.

Регресія Кокса (модель пропорційних ризиків) – прогнозування ризику настання події для об'єкту, що розглядається, та оцінка впливу завчасно визначених змінних (предикторів) на цей ризик. Ризик розглядається як функція, що залежить від часу. Модель полягає в припущенні, що функцію ризику (чи функцію інтенсивностей відмов), можна факторизувати, тобто подати у вигляді добутку двох функцій:

$$h(t) = h_0(t) \cdot y(z_1, \dots, z_m),$$

де $h_0(t)$ - базова функція інтенсивності, що залежить, від часу, що минув після огляду, у (z_1, \dots, z_m) - функція досліджуваних ознак (значення маркерів).

Модель можна записати у такому вигляді:

$$h[(t), (z_1, z_2, \dots, z_m)] = h_0(t) * \exp(b_1 * z_1 + \dots + b_m * z_m)$$

Базова функція інтенсивності $h_0(t)$ може розглядатися тепер як функція інтенсивності за рівності нулю всіх незалежних змінних або ко варіант.

Загальне завдання полягає в тому, щоб за спостереженнями за часом життя оцінити h_0 та невідомі коефіцієнти $b_1 \dots b_m$.

Модель можна лініаризувати, поділивши обидві частини співвідношення на $h_0(t)$ і взявши натуральний логарифм від обох частин:

$$\log\{h[(t), (z...)]/h_0(t)\} = b_1 * z_1 + \dots + b_m * z_m$$

Факторизована модель має ту чудову властивість, що для оцінки її параметрів потрібно не так багато спостережень, як знадобилося б для не факторизованої моделі.

Отже, методика збору матеріалу дослідження, методи використаної діагностики і методи статистичного аналізу отриманих результатів є відповідними меті та завданням кваліфікаційної магістерської роботи.

РОЗДІЛ 3.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Визначення підтипу пухлин, за допомогою гістологічних досліджень.

Під час гістологічного дослідження проаналізовано 58 випадків хвороби на рак молочної залози. В цих дослідженнях прослідковується недооцінка ступеня клітинної атипії і висловлена підозра про наявність РМЗ. У більшості пацієнтів 49 виявлено ППР, а саме змішана карцинома у восьми пацієток та у сорока одної пацієнтки інвазивний папілярний рак. У дев'яти пацієток діагностовано протоковий неінвазивний і мікроінвазивний рак (цитологічно в них прослідковується наявність внутрипротокової папіломи).

Найбільш часто причиною розвитку злоякісних процесів є:

- гіперплазія протокового епітелію. З 58 висновків атипова гіперплазія епітелію виявлена в 48 випадках, проста протокова гіперплазія - в двох. Другий за частотою нозологічною формою, яка веде до гіпердіагностики раку, є фіброаденома. В нашому дослідженні фіброаденома була діагностована у 3 з 10 пацієнтів. При ретроспективному перегляді препаратів в мазках виявлена виражена проліферація клітин епітелію залози. Клітини мономорфні, дрібного розміру, розташовані в невеликих скупченнях і пластах. Ядра переважно округлої форми, ядерний поліморфізм виражений слабо, в одиничних клітинах видно дрібні ядерця. фон препарату представлений рясними слизовими масами з включеннями капілярів (рис. 1, 2). В даному випадку цитологічне висновок про наявність фіброаденоми було обумовлено низьким ступенем клітинної та ядерної

- атипії, хоча виражений слизовий фон препарату, велика кількість матеріалу,
- відсутність в мазках елементів строми і міоепітеліальних клітин, характерних для фіброаденоми, були недооцінені. У другій пацієнтки при цитологічному дослідженні відзначено лише проліферація протокового епітелію.

При ретроспективному перегляді в мазках виявлено проліферативний епітелій залози у вигляді компактних щільних шарів, що складаються з дрібних

епітеліальних клітин зі слабо вираженими ознаками ядерного поліморфізму. Слиз в тлі препарату був відсутній (рис. 3.1.1).

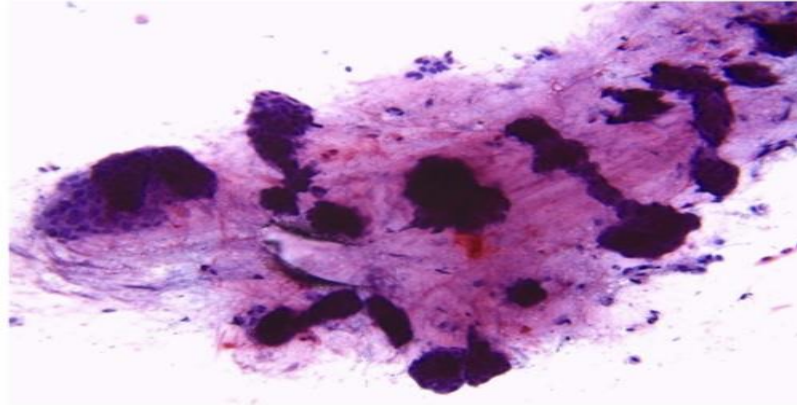


Рис. 3.1.1. Слизовий рак. ТАБ. Окраска гематоксилином.

При перегляді цитологічного матеріалу в мазках виявлені нечисленні клітини епітелію дрібного розміру з невеликими ядрами, помірним ядерним поліморфізмом і слабо ядерної гіперхромією. Клітини розташовані в невеликих групах і розрізнено. Також присутня клітинна атипія міоепітеліальні клітини клітин, численні гістіоцити в тлі препарату.

Виявлено велику кількість дисоційованих клітин з інтактною цитоплазмою, серед яких зустрічаються клітини веретеноподібної форми і овальної форми, можливо (рис. 3.1.2).

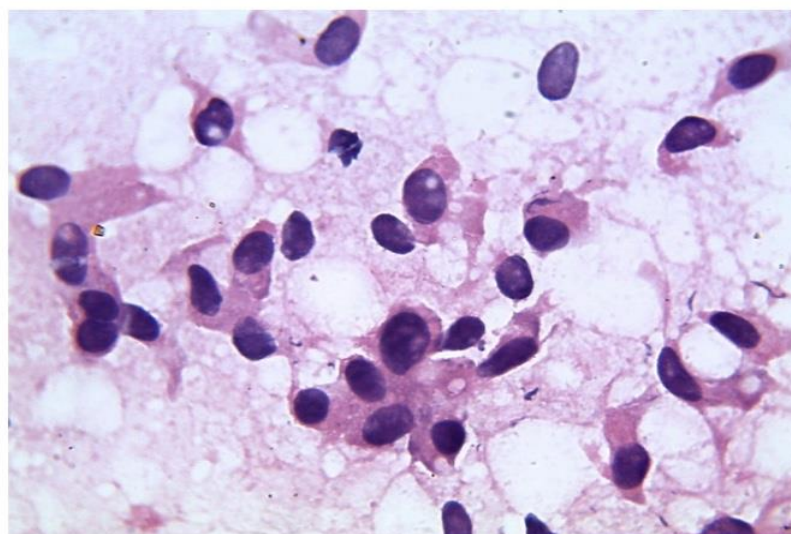


Рис. 3.1.2. Папілярний рак. ТАБ. Окраска ГЕ. Збільшення об'єктиву 100х.

У трьох пацієнок при остаточному гістологічному дослідженні виявлено ПР. У однієї пацієнтки при первинному цитологічному дослідженні виявити переконливі ознаки злоякісного процесу не вдалося. При перегляді препаратів виявлені численні пласти проліферативних епітеліальних клітин зі слабо поліморфними ядрами. В тлі препарату - фрагменти стромы і голі ядра, характерні для цитологічної картини фіброаденоми. Частина пластів має структуру «бджолиних сот». відзначено порушення впорядкованості розташування клітин в пластах, помірна ядерна гіперхромія. Структура хроматину рівномірна, ядерця відсутні, мітози не виявлені (рис. 3.1.3).

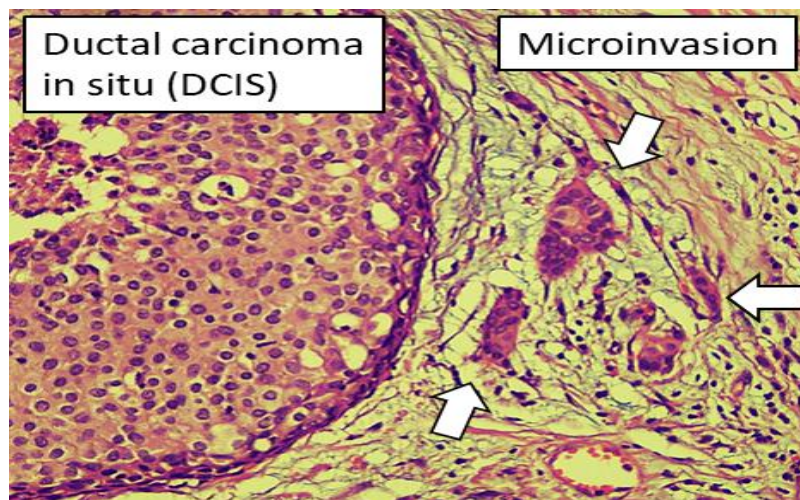


Рис. 3.1.3. Інвазивний протоковий рак. ТАБ. Окраска ГЕ.

Гістопатологічне зображення з протоковоклітинного раку in situ (DCIS) молочної залози. DCIS з мікроінвазією, що визначається як вогнище інвазивного раку розміром до 1,0 мм (рис. 3.1.4).

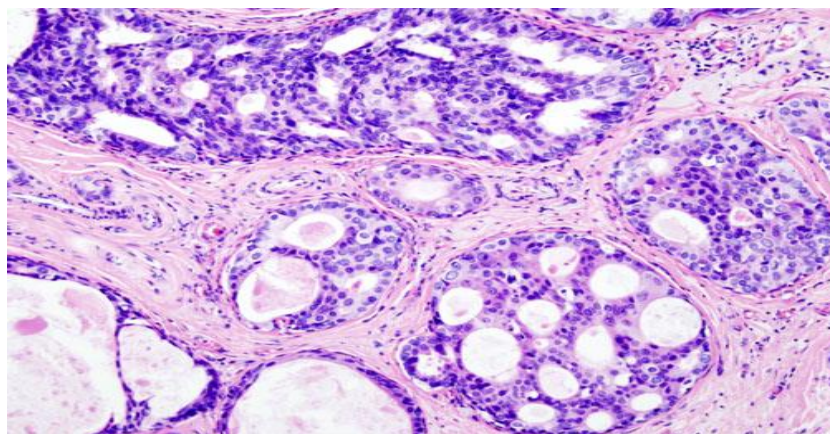


Рис. 3.1.4. DCIS з мікроінвазією ТАБ. Окраска ГЕ.

Імуногістохімія кальпоніну при протоковій карциномі *in situ*, виділяючи міоепітеліальні клітини навколо всіх пухлинних клітин, тим самим виключаючи інвазивну протокову карциному (рис 3.1.5).

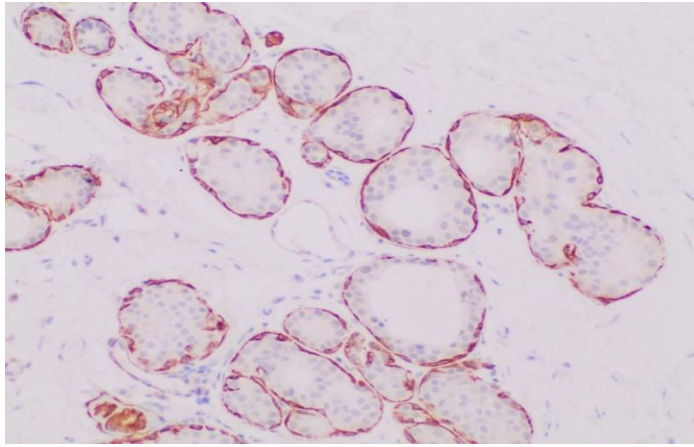


Рис. 3.1.5. Інвазивна протокова карцинома. Окраска ГЕ. Збільшення об'єктиву 100х.

3.2 Визначення підтипу пухлини, за допомогою ІГХ дослідження

Для виконання ІГХ досліджень були відібрані 60 пацієнтів з клінічним діагнозом РМЗ або підозра на рак. Дослідження виконували на матеріалі, отриманому шляхом зіскрібка з поверхні пухлини, видалених під час хірургічного втручання. У кожному разі оцінювали експресію рецепторів естрогену, прогестерону, Кі-67 і онкопротеїни HER-2. За результатами ІГХ дослідження, в 50 з 60 випадків експресія ER була позитивною, в 10 – негативною (рис. 3.2.1).

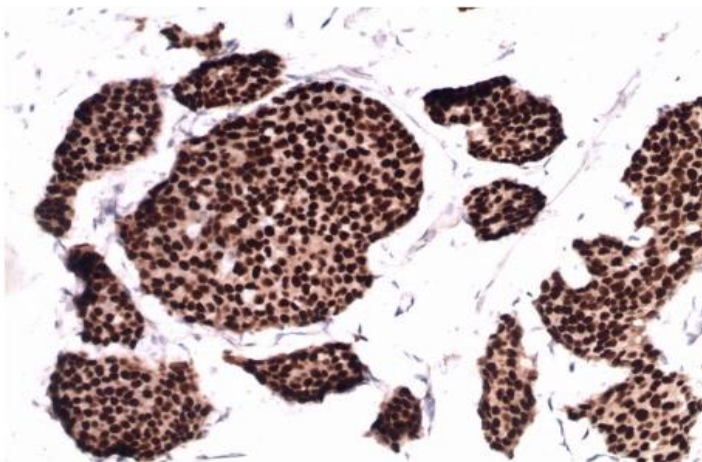


Рис.3.2.1. Імуногістохімічна експресія рецепторів естрогену в клітинах РМЗ. Кількість пофарбованих ядер пухлинних клітин 10.0%.

Результати імуногістологічних реакцій при визначенні експресії естрогену представлені в таблиці. 3.2.1.

Таблиця 3.2.1.

Результат	Позитивний	Негативний
Позитивний(3-8балів)	33	4
Негативний(0-2 балів)	2	10
Усього	35	14

Імуногістохімічна експресія рецептору прогестерона у пацієнтки з РМЗ. (рис. 3.2.2).

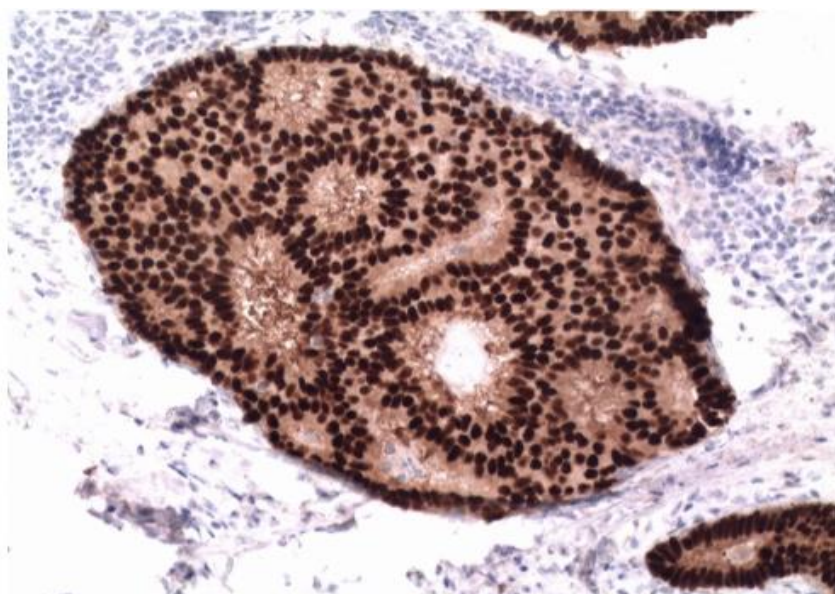


Рис. 3.2.2. Кількість пофарбованих ядер пухлинних клітин 100%(5 балів), інтенсивність фарбування 3 бали. $TS-5+3=8$ балів.

Результати ІГХ визначення рецептору прогестерону (таб. 3.2.2).

Таблиця 3.2.2.

Результат	Позитивний	Негативний
Позитивний(3-8балів)	29	4
Негативний(0-2балів)	10	9
Усього	39	17

Імуногістохімічна експресія Ki-67 в клітинах РМЗ. Кількість пофарбованих ядер-10% (рис. 3.2.3).

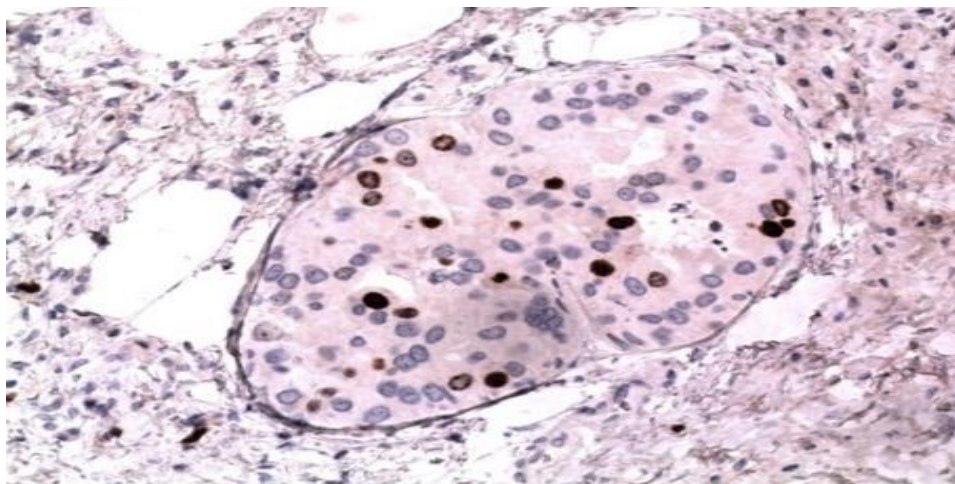


Рис. 3.2.4. Окраска ГЕ. Збільшення об'єктиву 200x

Результати маркеру проліферація Ki-67, що відображається в таблиці 3.2.3.

Таблиця 3.2.3

Результати маркеру проліферація Ki-67

Індекс Ki-67	Високий (більше 20%)	Низький (менше 20%)
Високий (20% і більше)	27	3
Низький (менше 20%)	1	11
Усього	28	14

За результатами ІЦХ пухлина була HER-2 негативної у 37 пацієнтки. Із них за даними ІГХ у однієї пацієнтки виявлена експресія HER-2 «3 +», у трьох - «2 +», 33 - експресія «1+» або «0». У пацієток з невизначеним висновком ІГХ виконано FISH-дослідження, ампліфікація гена не визначена ні в одному з трьох спостережень. Таким чином, при ІЦХ дослідженні в одному випадку дано псевдонегативний висновок. У 6 пацієток за даними ІЦХ була виявлена HER-2 позитивна (3+) пухлина. У 5 з них за результатами ІГХ експресія HER-2 також позитивна «3+», у однієї пацієнтки - негативна «1+». Таким чином, 1 випадок розцінений як хибнопозитивний. У 3 пацієток за результатами ІГХ експресія HER-2 оцінена як невизначена (2+). За результатами FISH-аналізу в цих трьох зразках

ампліфікація гена не визначена. Зіставлення всіх 4 маркерів (ER, PR, Ki-67 і HER-2) і встановлення молекулярно-генетичного підтипу пухлини було проведено у 40 хворих.

За даними ІГХ, у 15 хворих визначено люмінальної А підтип, у 18 - люмінальної В, у 2 - люмінальної HER-2 позитивний, у 1 - HER-2 позитивний нелюмінальний, і у 4 - тричі-негативний підтип. Таким чином імуногістохімічний метод дослідження біологічних маркерів є надійним (таб. 3.2.4).

Таблиця 3.2.4.

Молекулярно-біологічні підтипи РМЗ

Підтип РМЗ	ІМХ характеристика	Кількість пацієнтів
Люмінальний А тип	ER/PrR (+) Her-2 (-) Ki-67 < 20%	15
Люмінальний В Her2 негативний	ER/PrR (+) Her-2 (-) Ki-67 > 20%	18
Люмінальний В Her2 позитивний	ER/PrR (+) Her-2 (+) Ki-67 > 20%	2
Нелюмінальний Her2 позитивний	ER/PrR (-) Her-2 (+) Ki-67 > 20%	1
Тричі-негативний Базальноподібний тип	ER/PrR (-) Her-2 (-) Ki-67 > 20%	4
Всього		40

1. Розвиток процесів малігнізації на початкових стадіях вузлової форми раку молочної залози у пацієток постменопаузного і клімактеричного вікових періодів виявляло паралелізм з різким збільшенням вмісту в крові естрогенів на тлі абсолютного дефіциту прогестерону.

2. У хворих під час пременопаузи і клімактеричному періоду виникнення раку залежить від рівня естрадіолу і прогестерону в крові. У постменопаузі частіше виникає рак гормонозалежний.

3. Гіперестрогенія є одним з провідних патогенетичних чинників раку молочної залози.

Експресія білка p53 виявлена більш ніж у половині досліджених зразків РМЗ, що відповідає даними літератури про високу частоту мутацій гена p53 в пухлинах різних локалізацій, включаючи і злоякісні новоутворення молочної залози. Усі пацієнтки залежно від рівня експресії p53 були розподілені на три підгрупи: 1-а - хворі, у яких рівень експресії становив 0-10%, 2-я - 11-50%, 3-я - у яких вивчений показник склав $> 50\%$, згідно інтерпретації результатів імуногістохімічної лабораторії виведені результати в таб. 3.2.5.

Таблиця 3.2.5.

Рівень експресії білка p53 в пухлини РМЗ за даними імуногістологічних досліджень

Експресії білка p53 у пухлині %	число хворих	
	Абс.	%
0 до 10	12	20,6 ± 3,2
11- 50	37	63,8 ± 2,4
більше 50	9	15,6 ± 3,2

У різних типах пухлин причинами їх утворення є мутації в гарячих точках гена p53. Мутація або навіть невелика зміна форми p53 гена призводить до втрати супресивних властивостей і стимуляції пухлинного процесу. У низці досліджень було показано, що зміни в гені p53 свідчать про поганий прогноз у хворих на РМЗ.

Утворення та накопичення клону злоякісних клітин пов'язане у тому числі і з блокуванням програми апоптозу, що є важливим фактом, хоч і недостатньо вивченим. Постійна активація промоторів пухлинного росту призводить до фенотипованих змін трансформованих клітин, які набувають підвищеної здатності до проліферації та втрачають здатність до диференціювання. Завдяки цим

властивостям вони мають переваги перед клітинами нормальних тканин при зростанні та виживанні в однакових умовах. Імуногістохімічна експресія p53 в клітинах РМЗ. кількість пофарбованих ядер 30% (рис. 3.2.4).

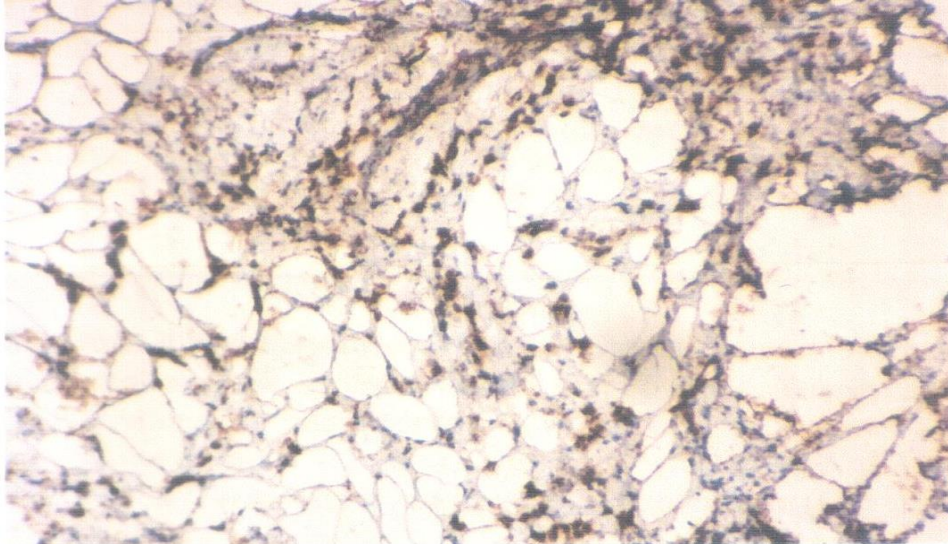


Фото 5 Експресія p53, x200

Рис. 3.2.4. Окраска ГЕ. Збільшення об'єктиву 200х. Імуногістохімічна експресія p53 в клітинах РМЗ. кількість пофарбованих ядер 30% .

Актуальним є те, що нездатність клітин зазнати апоптоз може бути одним із факторів, що зумовлюють патогенез різних захворювань людини, включаючи рак, аутоімунні захворювання та вірусні інфекції.

В цілому, підсумовуючи вищевикладені дані, можна зробити висновок, що ступінь агресивності клінічної течії РМЗ залежить, поряд з багатьма клінічними та молекулярно-біологічними характеристиками пухлини, та від експресії мутантного білка p53, що підтверджують дані літератури. Таким чином, експресія білка p53 в клітинах РМЗ може бути прогностичним фактором, що свідчить про високий метастатичний потенціал пухлини.

Експресію онкомаркера p53 оцінювали на зразках РМЗ, вона відрізнялася інтенсивністю і локалізації фарбування. За позитивну реакцію приймали фарбування з інтенсивністю 2+/3+ більш ніж 10% пухлинних клітин. Фарбування зі слабкою інтенсивністю та з невідповідною локалізацією відносили до негативної реакції. Більшість цих мутацій повністю або частково інактивують p53. За

нормальних умов так званий дикий тип білка p53 не можна виявити через короткий період напіврозпаду. Мутантні білки накопичуються в ядрі клітини, що викликано зміною їхньої просторової будови та збільшенням періоду напіврозпаду. Накопичуваний в ядрі мутантний білок P53 визначається імуногістохімічним (ІГХ) методом. Однак достовірність ІГХ методу знижується через те, що, з одного боку, не всі мутації призводять до синтезу стабільних білків, які накопичуються в ядрі клітини (хибнонегативний результат), а з іншого боку, дикий тип білка p53 може накопичуватися в ядрі клітини, що пов'язано з пошкодженням ДНК або є результатом зв'язування з іншими клітинними білками (хибнопозитивний результат). За даними літератури, кількість хибнопозитивних та хибнонегативних результатів при визначенні мутацій p53 у клітинах РМЗ ІГГ методом у сумі не перевищує 25%.

Вивчення зв'язку між мутацією TP53 та іншими факторами прогнозу перебігу РГЗ стало предметом багатьох досліджень. Існують також дослідження, у яких вивчали значення мутацій P53 як незалежного фактору прогнозу. Проте, інтерпретація отриманих у дослідженнях результатів ускладнюється через описані вище недоліки ІГХ методу щодо мутації гена TP53. Але все ж таки виявлена методом ІГХ гіперекспресія білка p53 найчастіше асоціюється з несприятливими факторами прогнозу перебігу РГЗ, а саме: ЕР- та ПР-негативним статусом пухлин, гіперекспресією Her2/neu, високим мітотичним індексом, низьким ступенем диференціювання, що клінічно виражається низьким загальним без рецидивним виживанням .

Мутації p53 нерівномірно розподілені між різними молекулярними підтипами РГЗ: у 10-20% випадків - при люмінальному А, у 13-31% - при люмінальному Б, у 22-71% - при Her2 і у 36-82% - при тричі негативному молекулярному підтипі, але при базальноподібному варіанті тричі негативного РГЗ мутації p53 виявляються у 90-95% .

Нами були вивчені рівні експресії ІГХ маркерів – Ki67, p53. У той же час розподіл рівнів експресії p53 у спільній вибірці (з включенням нульових значень)

полімодальний. У зв'язку з дискретністю оцінки експресії та малою кількістю інтервалів поділу Ki67 дослідження закону розподілу не виконано. При подальшому аналізі використано методи непараметричної статистики.

В результаті аналізу парних кореляцій досліджуваних ПХ маркерів у спільній вибірці виявлено достовірні ($p < 0,01$) зв'язки експресії Ki67 з p53. Обидва маркери проліферації подібно корелюються з іншими досліджуваними параметрами, що узгоджується з даними літератури.

Експресія імуногістохімічних маркерів в залежності від характеристик первинної пухлини та метастазування в регіонарні лімфатичні вузли.

Зв'язок експресії маркерів, що вивчаються, з розмірами первинної пухлини.

Статистичний аналіз показав відсутність суттєвих відмінностей у рівнях експресії ПХ маркерів у пухлинах різного розміру. Розмір пухлини у спільній вибірці достовірно корелює лише з наявністю некрозу в пухлини ($R = 0,43, p < 0,01$).

Аналіз кореляцій між експресією досліджуваних маркерів та розмірами пухлини (при порозі поділу 30 мм) виявив наявність тісного зв'язку експресії Ki67 ($p < 0,01$). Маркери проліферації Ki67 групи пухлин більше 30 мм включно достовірно корелюють з експресією p53 ($p = 0,01$). Це, можливо, свідчить про різну роль експресії p53 на різних стадіях розвитку пухлини та про посилення впливу апоптозу зі збільшенням розмірів пухлини. Відсутність достовірних кількісних змін дозволяє припустити наявність якісних змін активності p53 в міру пухлинної прогресії.

Зв'язок маркерів, що вивчаються, зі ступенем диференціювання пухлини.

Розмір пухлини був пов'язаний зі ступенем диференціювання. Відмінності в рівнях експресії Ki67 між високо- та помірно диференційованому. При несуттєвому, проте при зниженні диференціювання пухлини від помірно до низько диференційованої експресія Ki67 зростає ($p = 0,03$). Результати численних порівнянь за критерієм Краскела-Уолліса аналогічні.

Частка p53-негативних випадків у помірно і низько диференційованих пухлинах однакова, а високо диференційованих пухлинах вона на 32% вище

($p=0.02-0.03$), тобто. в пухлинах високого ступеня злоякісності експресія мутантного p53 зустрічається рідше.

Тільки високо диференційовані пухлини (G1) досліджуються ІГХ параметрами, що взаємопов'язані з високим рівнем достовірності ($p<0,04$). У разі зниження диференціювання (групи G2 і G3) ці залежності стають недостовірними. Тобто, низько диференційовані пухлини мають суттєвий дисбаланс, між основними визначальними життєдіяльності пухлини, а саме процесами проліферації, апоптозу та міжклітинної адгезії. Винятком є кореляція між рівнями експресії маркерів проліферативної активності – Ki67 та p53, яка залишається достовірно високою, незалежно від ступеня диференціювання пухлини.

Зв'язок маркерів, що вивчаються, з наявністю некрозу в пухлини.

При порівнянні рівнів експресії досліджуваних маркерів, залежно від наявності або відсутності некрозу, в пухлинах (у підгрупах з наявністю метастазів у регіонарні лімфатичні вузли і без їх ураження) встановлено, що експресія Ki67 корелює з наявністю некрозу, тільки в метастазуючих пухлинах $p=0,02$.е. І рівень ПА (за експресією Ki67) що зумовлює розвиток некробіотичних процесів, лише у метастазуючих пухлинах.

Зв'язок маркерів, що вивчаються, з метастазуванням в регіонарні лімфатичні вузли.

Відмінностей середніх величинах досліджуваних параметрів між групами N і N2 за критерієм Манна-Уїтні не виявлено, тому надалі хворі з метастазами регіональні лімфатичні вузли об'єднані в групу N+.

Порівняння підгруп No і N+ показало їх достовірну різницю за розмірами пухлини та експресії p53. Середній розмір первинних пухлин, що метастазують у лімфатичні вузли, на 20% більше; експресія p53, навпаки, істотно знижена, тобто пухлини, що мають високу експресію p53, мають більш високий рівень злоякісності; при підвищеній експресії p53 метастази спостерігаються частіше. Виявлено тенденцію ($p=0,07$) до підвищення експресії Ki67 при метастазуванні в регіональні лімфатичні вузли.

Представляють інтерес не тільки середні величини експресії маркерів, що вивчаються, але і зміна їх взаємодії між собою в залежності від наявності метастазів в лімфатичні вузли. З цією метою проведено аналіз парних кореляцій у підгрупах.

В обох групах рівні експресії параметрів, що вивчаються, не корелюють з розміром пухлини. Рівні експресії Ki67 та p53 достовірно пов'язані між собою, характер і сила зв'язків в обох групах однакові – відмінності у коефіцієнтах кореляції відсутні ($p=0,41-0,45$). Кореляції рівнів експресії Ki67 і p53 незначні групи N0 ($p=0,13-0,58$) і достовірні групи N+ ($p<0,05$, лише зв'язку p53), що свідчить про зростаючу роль експресії p53 при метастазуванні.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на рак молочної залози відповідь моноцитів на дію індукторів виявлялася насамперед через схильність до загибелі шляхом некрозу.

2. У хворих на рак молочної залози проапоптотичний ефект був набагато нижчим, особливо у хворих з гіперекспресією гена p53 (більше 50%).

3. У хворих на рак молочної залози високий проапоптотичний ефект у моноцитах був виявлений тільки у варіантах з низькою та помірною експресією гена p53 у клітинах пухлини РМЗ.

4. Оцінка експресії білка p53 в ядрах пухлинних клітин може бути використана як додатковий прогностичний фактор у хворих на РМЗ.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для виявлення груп ризику і необхідно виявляти мутації p53, що призводять до раку молочної залози.

2. Моноцити можуть застосовуватися як перспективні біохімічні модулятори, що впливають на активність генетичних процесів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Федоренко З. П. Бюлетень національного канцер-реєстру України / З.П. Федоренко, Л. О. Гулак, Ю. Й. Михайлович, Є. Л. Горох, А. Ю. Рижов, О. В. Сумкіна, Л. Б. Куценко // - Київ: Алерта, 2020. - №16
2. King S. A. Expression and mutation analysis of the p53 gene in uterine papillary serous carcinoma / S A. King, A. A. Adas, V A. LiVotai // Cancer 2010 – Vol. 75 – P. 2700-2705.
3. Щепотин І. Б. Клінічне значення мутацій p53 при раку молочної залози / І. Б. Щепотин // Клінічна онкологія —2012. — № 8 — С. 46—50.
4. Шуткін В. А. Генетичні чинники схильності до раку молочної залози / В. А. Шуткін, Е. Н. Імянітов, С. І. Бреніштер // - М.: Академічне видавництво LAP Lambert, 2014.- № 1- С.264.
5. Гінху Ф. Моноцити і макрофаги: шляхи розвитку і тканинний гомеостаз / Ф. Гінху, С. Юнг // - Nat Rev Immunol - 2014. - №14 - С. 392–404.
6. Йона С. Моноцити: підмножини, походження, долі та функції. / С. Йона, С. Юнг // Гематологія. - 2010. - № 17 - С. 53–59.
7. Лаповец Г. Є. Клінічна лабораторна діагностика: підручник / Г. Є. Лаповець, Г. Б. Лебедь, О. О. Ястремська та ін. // Миколаїв: 2-ге вид. Медицина, 2021. - № 3 — С. 29.
8. Щуров М. Ф. Взаємозв'язок між експресією p53 в ракових клітинах молочної залози і метастазуванням в регіонарні лімфовузли / М. Ф. Щуров // Запоріжжя: Онкологія, 2014. - № 3. — С. 203-205
9. Maraz A. Anticancer Res / A. Maraz, J. Furak, R. Palfoldi // 2011- Vol. 31 - P. 1431-1436.
10. Levine A. J. Взаємодія між епігенетичними змінами і білком p53 в стовбурових клітинах / A. J. Levine, S. L. Berger // Гени та розвиток, 2017. № 31 - С. 1195-1201.
11. Aylon Y. Парадокс p53: Що, як і чому? Перспективи холодної весни в медицині / Y. Aylon, M. Oren // 2016. С. 1-15.

12. Сербіна Н. В. Моноцитарно-опосередкований захист від мікробних патогенів / Н. В. Сербіна, Т. М. Цзя, Т. М. Хол, Е. Г. Памер // *Annu Rev Immunol* 2008.-№7 - С. 20-24.
13. Chen, J. Арешт клітинного циклу та апоптотична функція p53 у ініціюванні та прогресуванні пухлини / J. Chen // *Перспективи холодної весни в медицині*, 2016. С. 1-6
14. Берковец А. Н. Клиническая патофизиология / А. Н. Берковец // Київ: Здоров'я України. — 2020. -№17- С. 416
15. Ciliberti M. G. Peripheral blood mononuclear cell proliferation and cytokine production in sheep as affected by cortisol level and duration of stress / M. G. Ciliberti, M. Albenzio, C. Inghese // *Dairy Sci.* - 2017. -Vol. 100 - P. 750—756.
16. Бобкович К. О. Пропедевтика внутрішньої медицини / К. О. Бобкович, Є. І. Дзись, В. М. Жебель, Р. І. Ільницький, І. П. Кайдашев, В. А. Капустник, І. Ф. Костюк, М. А. Оринчак, О. В. Пішак, М. С. Расін, О. Я. Томашевська, В. М. Федосєєва, Т. А. Хомазюк, О. А. Хренов, О. О. Якименко, О. Б. Яременко // Під редакцією проф. М. С. Расіна. Вінниця: Нова книга.- 2014 р. -№9 - С. 429.
17. Бондарева В. А. Значение прогностических маркеров опухолевой прогрессии К i-6 7 и p 5 3 в пухлинах молочной желози / В. А. Бондарева // *Морфологія.* - 2007 -№3 - С. 753.
18. Hainaut P. 25 років дослідження p53 / P. Hainaut, K. Wiman // Нью-Йорк, - Спрінгер. - 2005 -№1
19. Berger A. H. Chapter 5: Cancer Susceptibility Syndromes / A. H. Berger, P. Pandolfi, T. S. Lawrence, S. A. Rosenberg // *Cancer: Principles and Practice of Oncology.* -2019. - Vol 77- P. 1006-1013.
20. Людвіг К. К. Зниження ризику та користь виживання при профілактичній хірургії у носіїв мутацій BRCA, систематичний огляд / К. К. Людвіг, Дж. Нойнер, А. Батлер, А. Л. Конг // *Ам Джей Сург.* 2016. - №2
21. Пожарискін К. М. Значення імуногістохімічних методів і для визначення характеру лікування і прогнозу пухлинних захворювань / К. М. Пожарискін // *Патологія дуги.*- 2010. -№3 - С. 97-103.

22. Esteva F. Prognostic markers in early breast cancer / F. Esteva, G. Hortobagyi // *Breast Cancer Res.* - 2008. P. 21—29.
23. Жданович А. І. Процеси ангіогенезу і апоптозу у вагітних з високим ризиком прееклампсії та їх імунологічна обумовленість / А. І. Жданович, Т. В. Коломійченко, Ю. О. Яроцька // *Імунологія та алергологія.* - 2015 - С. 137-143.
24. Wang X. Захист від зростання пухлини за межами впливу на клітинний цикл і апоптоз / X. Wang, E. R. Simpson, K. A. Brown // *Дослідження раку.* - 2015. Vol 75(23). P. 5001-5007.
25. McLaughlin R. Prognostic implications of p53 and bcl-2 expression in 108 women with stage two breast cancer / R. McLaughlin, D. O'Hanlon, T. McHale // - 2011. Vol. 170 (1): P. 11—31.
26. Ковальський О. В. Радіологія. Променева терапія. Променева діагностика; підручник для студентів вищого мед. навчальних закладів / О. В. Ковальський, Д. С. Мечев, В. П. Данилевич. – Вінниця: Нова Книга.-.2013. - №3 - С. 29-35
27. Резніков О. Г. Гормонозалежний канцерогенез / О. Г. Резніков // *Онкологія. Вибрані лекції для студентів і лікарів.* — Київ: Здоров'я України.- 2010. — С. 67-86.
28. Bardou V. J. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large / V. J. Bardou, G. Arpino // *Clin. Oncol.* - 2013. Vol. 21. P. 2013-2017.
29. Зозуля І. С. Медицина невідкладних станів: швидка і невідкладна медична допомога / І. С. Зозуля // *Підруч. для лікарів-курсантів післядипломної освіти, лікарів інтернів і студентів вищ. мед. навч. закл. IV рівня акредитації.* — Київ : Медицина. — 2012.
30. Тertiшний С. І. Цитологічна діагностика: навч. посіб / С. І. Тertiшний, Ю. Ф. Полковніков, О. О. Дядик, С. О. Руденко // - *Запоріжжя.*- 2019.- С.135-149.
31. Кулагіна Є. С. Епідеміологічні та молекулярні аспекти раку молочної залози / Є. С. Кулагіна // *Протокол.* - 2010. - С. 67-73.