

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

На правах рукопису

**ЛИНДІН МИКОЛА СЕРГІЙОВИЧ**

**УДК: 618.19-006.04-091.8-06:613.632(043.5)**

**МОРФОГЕНЕЗ ІНФІЛЬТРАТИВНОГО ПРОТОКОВОГО  
РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ В УМОВАХ ЗАБРУДНЕННЯ  
ДОВКІЛЛЯ СОЛЯМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ**

14.03.02 – патологічна анатомія

Дисертація на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук

Керівник – **Романюк Анатолій Миколайович**,  
доктор медичних наук, професор

Суми-2015

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ-----	4
ВСТУП-----	5
<b>РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	
1.1 Сучасні уявлення про рак молочної залози-----	13
1.2 Важкі метали і рак молочної залози-----	19
1.3 Характеристика рецепторів тканини раку молочної залози-----	28
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	
2.1 Скринінгове дослідження-----	39
2.2 Гістологічне дослідження тканини молочної залози-----	40
2.3 Імуногістохімічне дослідження тканини раку молочної залози-----	40
2.4 Визначення хімічного складу тканини раку молочної залози-----	43
2.5 Виділення та дослідження ДНК-----	45
2.6 Проведення морфометричних та математичних розрахунків-----	45
<b>РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ</b>	
3.1 Захворюваність на рак молочної залози в Сумській області за 2004-2014 рр. та їх клініко-морфологічна характеристика -----	47
3.2 Гістологічне дослідження інфільтративного протокового раку молочної залози-----	52
3.3 Дослідження елементного складу тканини інфільтративного протокового раку молочної залози-----	66
3.4 Дослідження рецепторів у пухлинній тканині-----	73
3.4.1 Дослідження ER, PR, HER2/neu, p53, Ki-67 та bcl-2 рецепторів у пухлинній тканині жінок з «екологічно-забруднених» районів-----	73
3.4.2 Дослідження ER, PR, HER2/neu, p53, Ki-67 та bcl-2 рецепторів у пухлинній тканині жінок з «екологічно-чистих» районів-----	86
3.4.3 Вивчення експресії MGMT, MMP1 та E-кадгерину у пухлинній тканині-----	90
3.4.4 Дослідження експресії VEGF та OPN-----	97

3.4.5 Вивчення експресії білка hsp90α-----	102
3.4.6 Дослідження якісного складу запального пухлинного імунного мікрооточення-----	105
3.5 Дослідження змін ДНК у пухлинних клітинах-----	111
3.5.1 Визначення фрагментації ДНК-----	111
3.5.2 Дослідження метилювання ДНК у пухлинній тканині-----	114
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ-----	121
ВИСНОВКИ-----	148
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ-----	150
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ-----	151

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ДФК-----	активні форми кисню
ВМ-----	важкі метали
ГА-----	гідроксиапатит
ДАБ-----	діамінобензидин
ІІ-1-----	інтерлейкін 1
ІПРМЗ-----	інфільтративний протоковий рак молочної залози
МЕ-----	мікроелементи
МЗ-----	молочна залоза
ПОЛ-----	перекисне окислення ліпідів
РМЗ-----	рак молочної залози
СВМ-----	солі важких металів
ER-----	рецептори до естрогену
FISH-----	флуоресцентна in situ гібридизація
HER2/neu-----	рецептори другого типу людського епідермального фактору росту
hsp-----	білок теплового шоку
MGMT-----	O <sup>6</sup> -метилгуанін ДНК-метилтрансфераза
MMP1-----	матриксна металопротеїназа 1
mt p53-----	мутантний тип p53
NF-KB-----	ядерний фактор
OPN-----	остеопонтін
PR-----	рецептори до прогестерону
Th1-----	T-хелпер 1-го типу
Th2-----	T-хелпер 2-го типу
VEGF-----	фактор росту ендотелію судин
wt p53-----	дикий тип p53

## ВСТУП

Рак молочної залози (РМЗ) займає перше місце серед усіх локалізацій злоякісних пухлин у жінок (30% захворюваності і 16-18% смертності). Щороку цю патологію виявляють у 16 тис. українок (Україна за показниками захворюваності на РМЗ посідає 5 місце у світі; рівень становить 64,5 на 100 тис. жіночого населення) [1] – кожні 35-37 хвилин виявляється новий випадок захворювання та щогодини вмирає жінка від РМЗ. Це найбільш часта локалізація злоякісного процесу у мешканок США (реєструється у кожній восьмій жінки) та у мешканок європейських держав (у кожній десятій) [2,3]. Рівень захворюваності за останні 40 років збільшився більш ніж утричі. Згідно даних американських авторів при локалізованих стадіях РМЗ 5-річне виживання досягає 90%, при залученні підпахвинних лімфатичних вузлів – 68%, а при виникненні віддалених метастазів – 18% [4].

Цій проблемі приділяється багато уваги в усьому світі, але досі невирішеними залишаються питання зниження захворюваності на РМЗ та смертності від нього. Не представляється можливим контролювати зростання захворюваності унаслідок відсутності ефективних шляхів первинної профілактики, залишаються відкритими питання діагностики РМЗ [5].

Порівнюючи захворюваність на РМЗ у високорозвинених країнах Європи та Америки з країнами Азії та Африки, достовірним залишається факт більшого ураження населення у більш урбанізованих державах [6]. Різна захворюваність у жінок похилого і молодого віку не може бути пов'язана тільки з порушенням гормонального стану та генетичною схильністю [7-9]. Це дозволяє стверджувати, що навколишнє середовище та ендогенні порушення, поряд з іншими факторами, займають суттєве місце в ініціації та перебігу неоплазій молочної залози (МЗ) [10].

Значні темпи індустріального розвитку, видобутку мінеральної сировини та енергетичних ресурсів призвели до збільшення антропологічних

навантажень на довкілля. Це зумовило забруднення ґрунтів, поверхневих водних ресурсів і, як наслідок, продуктів харчування людини солями важких металів (СВМ) [11]. У зв'язку з цим постійно зростає інтерес до вивчення впливу СВМ на організм людини.

Іноді дисбаланс мікроелементів (МЕ) у тканинах має природне біогеохімічне походження – за умов проживання людини на території з підвищеним вмістом важких металів (ВМ), тощо [12,13]. При вивченні стану навколишнього середовища в Сумській області встановлено, що в Середино-Будському, Шосткинському, Ямпільському районах відмічається підвищення в ґрунті солей заліза, марганцю, хрому, міді, кобальту, нікелю, свинцю та цинку [14]. Порівнюючи статистичні дані захворюваності на РМЗ у вищезазначених регіонах (99,2 на 100 тис. населення) з умовно «екологічно-чистими» районами (Краснопільський, Тростянецький та Велико-Писарівський райони) Сумської області, де захворюваність складає 25,7 на 100 тис. населення, впливає закономірна достовірність більшого ураження жінок пухлинним процесом в «екологічно-забруднених» районах.

Хоча досить добре з'ясований вплив зазначених факторів на нирки, печінку, гіпофіз, наднирники, кісткову систему, кров, органи травлення [15,16], на жаль, відносно мало досліджень присвячено вивченню впливу даних хімічних речовин на загальний стан здоров'я людини і ще менше – на участь у канцерогенезі. У тому числі не вивчено, як метали зумовлюють ініціювання та прогресування РМЗ.

Відомо, що канцерогенний вплив іонів ВМ реалізується як через механізми порушення структури ДНК своїм безпосереднім впливом на процеси транскрипції, трансляції та реплікації, так і через пригнічення системи антиоксидантного захисту. Деякі з іонів металів можуть порушувати функціонування клітин, а інші імітувати дію естрогену, впливаючи на гормональний стан жінки [17].

Можливість тканин накопичувати екзогенні речовини в умовах підвищеної їх кількості в навколишньому середовищі спонукає до вивчення

спроможності тканини МЗ акумулювати ВМ та з'ясувати механізми їхнього канцерогенного впливу на перебіг пухлинного процесу.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами**

Дисертаційна робота виконана у відповідності до плану наукових досліджень Медичного інституту Сумського державного університету і є частиною планової наукової теми кафедри патологічної анатомії №013U003315 «Морфогенез загальнопатологічних процесів» та держбюджетної теми №62.20.02-01.15/17. ЗФ «Морфофункціональний моніторинг стану органів і систем організму за умов порушення гомеостазу». Автор є безпосереднім виконавцем фрагменту науково-дослідної роботи.

### **Мета і завдання дослідження**

Метою дослідження є оптимізація морфологічної діагностики інфільтративного протокового раку молочної залози шляхом встановлення механізмів впливу солей важких металів на перебіг злоякісного процесу в молочній залозі, з'ясування патогенетичних особливостей канцерогенезу за умови накопичення важких металів у пухлинній тканині.

У зв'язку з поставленою метою визначені наступні *завдання*:

1. Провести порівняльний аналіз структури захворюваності та клініко-морфологічних особливостей інфільтративного протокового раку молочної залози у жінок, які мешкають в «екологічно-чистих» та «екологічно-забруднених» районах Сумської області за період 2004–2014 рр.

2. Вивчити елементний склад в тканині інфільтративного протокового раку молочної залози жінок з «екологічно-чистих» та «екологічно-забруднених» районів.

3. Встановити взаємозв'язок між накопиченням важких металів у пухлинній тканині та особливостями морфологічної картини пухлинного процесу в умовах мікроелементозу.

4. Виявити особливості рецепторного статусу тканини інфільтративного протокового раку молочної залози в умовах мікроелементозу.

5. Дослідити участь мікроелементів у дестабілізації геному та метилуванні ДНК тканини раку молочної залози.

6. З'ясувати патогенетичні механізми впливу важких металів на морфогенез інфільтративного протокового раку молочної залози.

*Об'єкт дослідження:* інфільтративний протоковий рак молочної залози.

*Предмет дослідження:* морфологічні та молекулярно-біологічні ознаки інфільтративного протокового раку молочної залози за умов накопичення важких металів у пухлинній тканині.

*Методи дослідження:* гістологічні, гістохімічні, імуногістохімічні, електронікроскопічні, молекулярно-генетичні, енергофотометричні, статистичні.

### **Наукова новизна одержаних результатів.**

Вперше встановлено взаємозв'язок між проживанням жінок в «екологічно-забруднених» регіонах і накопиченням важких металів у пухлинній тканині молочної залози. Показано, що неопластична тканина здатна акумулювати важкі метали, загальна кількість яких (Fe, Cu, Cr, Zn, Pb та Ni) в пухлині коливається від 51,21 мкг/г до 84,86 мкг/г (в середньому  $72,45 \pm 9,47$  мкг/г). Крім того, виявлено, що паренхіматозна частина неоплазії накопичує важкі метали в більшій кількості, ніж її стромальна складова. Виявлено, що жінки, які проживають в «екологічно-забруднених» районах, майже у два рази частіше хворіють на рак молочної залози, мають на 22,4 % більшу кількість важких металів у пухлинній тканині, вищі показники ( $p < 0,05$ ) експресії hsp90 $\alpha$  та менший рівень експресії рецепторів до стероїдних гормонів, ніж у матеріалі від жінок, які проживають у незабруднених регіонах.

Шляхом використання комплексу сучасних методів (гістохімічних, імуногістохімічних, молекулярно-генетичних, електронікроскопічних, енергофотометричних) встановлено позитивний кореляційний зв'язок ( $p < 0,05$ ) між підвищенням кількості важких металів у неопластичній тканині молочної залози та прогресуючою анаплазією пухлини, підвищенням рівня патологічної біомінералізації та імунної запальної інфільтрації, експресією прогностично-несприятливих рецепторів раковими клітинами (p53, Ki-67, HER2/neu, MGMT, MMP1, VEGF, OPN та hsp90), патологічним метилюванням ДНК та прогресуючим зростанням його фрагментації, що негативно відображається на перебігу злоякісного процесу.

Уточнені та доповнені дані про патогенетичні ланки негативного впливу важких металів на канцерогенез у молочної залозі, які через внутрішньоклітинні посередники стимулюють процеси патологічної біомінералізації та васкуляризації, стабілізують прогностично-несприятливі протеїни, дестабілізують генетичний матеріал та блокують активність прогностично-сприятливих рецепторів. Виявлено взаємозв'язок між якісними змінами в пухлинному мікрооточенні та особливостями рецепторного статусу пухлинних клітин.

### **Практичне значення отриманих результатів.**

На підставі результатів проведеного комплексного клініко-морфологічного та молекулярно-генетичного дослідження встановлено високий ризик розвитку РМЗ у жінок, які проживають в «екологічно-забруднених» районах та більш агресивний перебіг ІПРМЗ за умови накопичення важких металів в пухлинній тканині. Урахування при діагностиці ІПРМЗ визначених морфологічних та молекулярно-біологічних критеріїв несприятливого прогнозу дозволить прогнозувати перебіг захворювання та сприятиме диференційному підходу до лікування.

Дані дослідження дозволяють зрозуміти механізми впливу пухлинного мікрооточення на перебіг злоякісного процесу. Отримані результати

показують, як кількісні та якісні особливості мікрооточення впливають на прогресування пухлини, змінюючи її фенотипічні та генетичні особливості.

Запропоновані схеми впливу екзогенних чинників на злоякісний процес дозволять поглибити розуміння патогенетичних взаємозв'язків у перебізі непластичного процесу в практичній діяльності патологоанатомів.

Основні положення та висновки дисертації можуть знайти застосування в науковій роботі, а також у навчальному процесі кафедр анатомії, гістології, цитології та ембріології, нормальної фізіології, патологічної анатомії, гінекології, інших теоретичних і клінічних кафедр для деталізованого вивчення перебігу РМЗ. Впровадження результатів дослідження в навчальний процес медичних вищих навчальних закладів буде мати практичне значення для підготовки майбутніх патологоанатомів, мамологів, гінекологів та онкологів.

Матеріали дисертаційної роботи включено до навчального процесу на кафедрах патологічної анатомії СумДУ, Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського, Харківського національного медичного університету, Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького, Запорізького державного медичного університету, Дніпропетровської медичної академії, Національної медичної академії післядипломної освіти імені П.Л. Шупика, Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, Буковинського державного медичного університету, ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава. Особливості гістологічної картини інфільтративного протокового раку молочної залози та його імуногістохімічного профілю враховуються при діагностиці в роботі Сумського, Житомирського, Львівського та Тернопільського обласних патологоанатомічних бюро.

### **Особистий внесок здобувача.**

Дисертаційна робота є самостійною завершеною науковою працею. Особистий внесок автора полягає у формуванні мети і завдань проведених досліджень, заборі та дослідженні матеріалу, скринінговому аналізі результатів гістологічних та імуногістохімічних досліджень. Дисертантом самостійно проведені морфологічні, молекулярно-генетичні, імуногістохімічні дослідження тканини молочної залози, статистична та математична обробка одержаних результатів, проаналізовано літературу з проблемної тематики та проведена інтерпретація отриманих даних, визначені основні положення, які виносяться на захист і висновки дисертацій, оформлена робота. Вивчення хімічного складу тканини МЗ проведено на базі Центру морфологічних досліджень та кафедри технічних систем і енергоефективних технологій СумДУ (завідувач кафедри д.т.н., проф. Залога В.О.). Рівень метилювання ДНК визначали на базі Інституту монокристалів Національної академії наук України (завідувач лабораторії к.х.н., н.с. Софронов Д.С.).

### **Апробація результатів дисертації.**

Основні положення дисертаційної роботи оприлюднені на Міжнародній науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини» СумДУ (2012, 2013, 2014, 2015), XV конгресі Світової Федерації Українських Лікарських товариств у Буковинському державному медичному університеті (2014), Всеросійській конференції, присвяченій 155-річчю кафедри патологічної анатомії Військово-медичної академії імені С.М. Кірова «Актуальные вопросы патологической анатомии в мирное и военное время» (2014), XI та XII Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна (2014, 2015), Всеукраїнській науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Здобутки теоретичної

медицини – в практику охорони здоров'я» та «Актуальні проблеми сучасної патоморфології та патофізіології» Запорізького державного медичного університету (2015).

### **Публікації.**

Матеріали дисертаційної роботи висвітлені у 16 працях, зокрема, у 6 статтях, з яких 4 представлені у наукових фахових виданнях України, 2 – у закордонних журналах, які індексуються наукометричною базою Scopus, 10 тез опубліковано в матеріалах науково-практичних конференцій; 5 наукових робіт опубліковано одноосібно.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.

#### 1.1. Сучасні уявлення про рак молочної залози.

Рак молочної залози – злоякісна пухлина залозистої тканини молочної залози. У світі це найчастіша форма раку у жінок, що трапляється протягом життя. Також це друге за частотою після раку легень онкологічне захворювання в популяції взагалі (враховуючи чоловіче населення).

В якості етіологічних чинників виникнення РМЗ описані порушення харчування, гормональні розлади, спадкова схильність, фактори зовнішнього середовища [18-21]. Їжа, перенасичена легкозасвоюваними жирами [18,22], гіподинамія та невідповідність між енергопостачанням та енерговитратами виступають факторами ризику в зв'язку з небезпекою розвитку ожиріння та ектопічним ендогенним синтезом стероїдних гормонів [23,24].

Порушення гормонального гомеостазу, які супроводжуються підвищенням кількості естрогену, прогестерону та інших гормонів, стимулюють проліферацію епітелію МЗ, підвищуючи ризик канцерогенезу [25,26]. Ризик розвитку РМЗ підвищується при наявності патології МЗ (фіброзна-кістозна хвороба, атипова внутрішньопотокова та внутрішньочасточкова проліферація і т.д.) [21,27].

Останнім часом з'явилося велика кількість публікацій про вплив спадковості на ініціацію пухлинного процесу в МЗ. Розвиток неопластичного процесу пов'язаний з наявністю генів BRCA1 та BRCA2 та їх поліморфізмом [28-30], та менш пенетрантних генів PTEN, P53, ATM, PALB2, CDH1, CHEK2, FANC, NBS1 та інші [31-34].

Про роль вірусів (ретровірусу, вірусу Епштейн-Бара) в генезі РМЗ проведено не одне дослідження, отримані неоднозначні результати, тому питання про вплив біологічного агенту на канцерогенез в МЗ залишається відкритим [35,36].

З'явилися відомості про більшу схильність до РМЗ у жінок, які працюють у нічний час в освітлених приміщеннях, що пов'язано з дефіцитом мелатоніну, який виробляється у темну пору доби та має естрогенстабілізуючу дію [37,38]. Канцерогенною дією стосовно РМЗ володіють також алкоголь та тютюновий дим [39].

Неопластичні захворювання МЗ, беззаперечно, є також екологічно-залежною патологією, про що свідчить їх стабільний ріст у розвинутих країнах світу [17]. Питання впливу навколишнього середовища на тканину МЗ неодноразово підіймалося в дослідженнях багатьох авторів і залишається суперечливим у науковій літературі [40,41]. Пов'язано це з тим, що для РМЗ характерний дуже тривалий латентний період – між впливом факторів ризику і кінцевим проявом захворювання може пройти кілька десятків років [42]. Оскільки відомо, що естрогени сприяють розвитку РМЗ, то особливі підстави для занепокоєння викликає той факт, що різні пестициди та хімічні речовини, присутні в пластику, косметиці та продуктах харчування, можуть імітувати дію естрогену [43-45].

Серед багатьох причин розвитку РМЗ мікроелементози важкими металами займають не останнє місце [46-48]. Дослідження, проведені вченими Домініканського Каліфорнійського університету показали, що клітини РМЗ стають більш агресивними, якщо вони довго піддаються впливу малих концентрацій ВМ, які часто зустрічаються в косметиці, продуктах харчування, воді та повітрі. Спроможність мікроелементів імітувати дію естрогену [43,45], підсилювати проліферативну активність клітин ангиогенезу [49,50], впливати на процеси апоптозу та проліферативну активність [51,52], зменшувати адгезивні властивості клітин [53] призводить до стимулювання пухлинної трансформації, ініціації та прогресії неопластичного процесу.

Пухлини МЗ класифікують за багатьма критеріями: за системою ТМN, клінічними стадіями, гістологічними проявами, ступенем диференціювання, експресією рецепторів пухлинними клітинами, наявністю генного поліморфізму [3,54-56].

Згідно класифікації ВООЗ інвазивні форми РМЗ серед всіх різновидів пухлинних процесів у МЗ займають значну частину (26 типів інвазивного РМЗ) [3]. Серед них є такі типи, які щодня зустрічаються в роботі морфологів (інфільтративний протоковий та дольковий рак, медулярний рак), так і випадкові гістологічні форми (запальний, онкоцитарний, апокринний рак і т.д.). Серед всіх типів інвазивного РМЗ у 50-80% випадках при гістологічному дослідженні біопсійного та оперативного матеріалу виявляється інфільтративний протоковий рак молочної залози (ІПРМЗ) [55]. Нажаль, ця гетерогенна група аденокарцином не має достатньої кількості специфічних характеристик для однозначного встановлення діагнозу ІПРМЗ в якості конкретного гістологічного типу, так як це відбувається у випадку, наприклад, дольової або трубчастої карциноми [56,57]. На практиці буває важко відрізнити вид інвазивної карциноми, тоді на допомогу приходять імуногістохімічні методи діагностики з визначенням рецепторів, специфічних для ІПРМЗ, таких як цитокератини, Е-кадгерин та інші [58]. Морфологічні особливості пухлини МЗ дуже варіабельні, маючи ознаки дифузної інвазії клітин у строму у вигляді трабекулярних або тубулярних структур з різною картиною в міжклітинному пухлинному просторі [59].

На підставі аналізу 73 випадків РМЗ в 1925 році R.V.Greenough з Бостону виділив 5 критеріїв визначення ступеня злоякісності інфільтруючих форм РМЗ: наявність часточок, протоків та залозистоподібних структур, ступінь секреторної активності, клітинну атипію, наявність гіперхромних ядер та кількість мітотичних фігур [60]. В 1957 році в класичній праці Bloom-Richardson була сформована більш спрощена схема гістологічних критеріїв – градація за Scaff-Bloom-Richardson за 3 характеристиками, яка виключила оцінку наявності секреторної активності та об'єднала в одну рубрику гіперхроматоз та ядерну атипію [61]. Кожен з трьох показників оцінюється від 1 до 3 балів. Для більш спрощеної оцінки гістологічного диференціювання РМЗ С.W.Elston та I.O.Ellis розробили напівкількісний метод оцінки, згідно якого пухлина з загальною сумою балів від 3 до 5

вважалася низького ступеня зляжкності, з сумою 6-7 балів – помірного ступеня зляжкності та з сумою 8-9 балів – високого ступеня зляжкності [62].

Згідно молекулярно-генетичної класифікації в більшості досліджень виділяють наступні варіанти РМЗ [63]:

- люмінальний тип А, який характеризується експресією рецепторів естрогену (ER) та/або прогестерону (PR), відсутністю рецепторів другого типу людського епідермального фактору росту (HER2/neu);
- люмінальний тип В – ER та/або PR позитивний, наявність експресії HER2/neu;
- HER2/neu позитивний – відсутність ER та PR, наявність HER2/neu;
- потрійний негативний – не експресується жоден з рецепторів.

На цьому поділ на молекулярно-генетичні підвиди не зупинився. На сьогодні відомо за різними авторами 7 або 8 клініко-морфологічних варіантів РМЗ, які включають поділ люмінального типу В на два підвиди (HER2/neu позитивний та HER2/neu негативний) з урахуванням проліферативної активності клітин, потрійний негативний РМЗ поділяють на без базальноклітинного фенотипу та з ним, оцінюючи експресію цитокератину 5, CD17 (c-kit), епідермального фактору росту 1-го типу і т.д. [64-66].

Класифікуючи кожний конкретний випадок, морфолог не тільки розширює морфо-гістологічний опис РМЗ, а й покращує встановлення прогнозу та цілеспрямовує лікування клініцистів.

На перебіг будь-якої неоплазії впливають не тільки особливості паренхіматозного компоненту пухлини, а й стан її стромы. У морфогенезі пухлинного процесу МЗ зміни якісного складу стромального компоненту мають важливе значення [67]. Серед них утворення біомінералізацій та лімфо-лейкоцитарна імунна реакція представляють неабиякий інтерес для вивчення морфогенезу пухлинного процесу. Відомо, що будь-яке відкладання солей кальцію є результатом протилежної дії активаторів та

інгібіторів мінералізації [68]. В якості інгібіторів описано дію Klotho-протеїну, матричного  $\gamma$ -карбоксіглютарової кислоти протеїну, фактору росту фібробластів, пірофосфату та інші [69]. Біопсії тканини РМЗ показали, що при патологічній біомінералізації надлишково експресуються білки кісткового матриксу, в тому числі кістковий сіалопротеїн, остеопонтін та остеонектін [70]. Мікровідкладання у тканині МЗ класифіковані на молекулярному рівні на 2 види і відрізняються між собою своїми фізичними і хімічними властивостями. Перший тип кальцифікацій складається з оксалату кальцію та пов'язаний з доброякісними новоутвореннями МЗ. Кальцифікати другого типу складаються з фосфату кальцію, в основному гідроксиапатиту (ГА) [71].

ГА – мінерал,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , з групи апатитів, гідроксильний аналог фторапатиту та хлорапатиту. Він є основною складовою кісток та зубів. У структурі ГА кальцієво-фосфорне співвідношення дорівнює 1,67 (в деяких випадках коливається від 1,33 до 2). Іони кальцію можуть бути заміщені на близькі за властивостями хімічні елементи (ізоморфне заміщення), в тому числі двовалентні іони ВМ, в результаті чого кальцієво-фосфорне співвідношення змінюється [72]. Саме цю властивість ГА використовують з метою очищення води від екзогенного забруднення СВМ, причому спорідненість до елементів зменшується в наступному порядку:  $\text{Pb} \rightarrow \text{Zn} \rightarrow \text{Fe} \rightarrow \text{Cu} \rightarrow \text{Ni} \rightarrow \text{Cr}$  [73]. Основна особливість біомінералів у тому, що вони являють собою агрегати, в яких мінеральна і органічна складові нерозривно та чітко пов'язані між собою, взаємодіючи за певними законами, співвідношення яких постійно змінюється при прогресуванні пухлинного процесу [67]. У дослідженнях деяких авторів показано, що присутність ГА в пухлинній тканині корелює з виявленням інвазивних форм РМЗ [6].

Як відомо, ріст і функціонування будь-якого органу і тканини підпорядковується загальному впливу нервової і гуморальної систем макроорганізму. Не виключенням є і пухлинна тканина. Але, на сьогоднішній день, в багатьох дослідженнях гостро обговорюється питання участі процесу

ауторегуляції та протипухлинного імунітету в ньому. Кількісний та якісний склад мікрооточення пухлини відіграє одну з ключових ролей. Відомості про їх вплив суперечливі. Дослідження взаємозв'язку імунної реакції зі ступенем поширеності РМЗ показали, що зі зменшенням рівня лейкоцитарної інфільтрації (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD37, CD38, CD163) навколо пухлини збільшується частота ураження регіонарних лімфатичних вузлів. Цей факт пояснюється участю клітин імунної системи, з одного боку, в оточенні пухлини та обмеженні подальшого її поширення, а з іншого, в здатності проявляти цитотоксичну дію проти фенотипово-чужорідних ракових клітин МЗ [74,75]. Іншою точкою зору є дослідження про стимулюючий вплив інфільтрату на прогрес канцерогенезу [76]. Показано, що імунне мікрооточення пухлини визначає проліферативну активність, міграцію та метастазування клітин. Цей процес здійснюється як завдяки здатності клітин сприймати сигнальні молекули типу прозапальних цитокінів, селектинів, хемокінів, джерелом яких є клітини запалення, так і самостійно їх виділяти [77]. Але, як виявилось, прогноз РМЗ залежить більше від якісного складу інфільтрації [78]. В дослідженнях продемонстровано позитивний вплив CD4<sup>+</sup> Т-хелперів 1-го типу (Th1) та CD8<sup>+</sup> Т-кілерів на перебіг злоякісного процесу. З іншого боку протікання РМЗ погіршується в присутності в клітинному імунному мікросередовищі CD8<sup>+</sup> Т-хелперів 2-го типу (Th2) і В-лімфоцитів [77,78].

Ядерний фактор (NF-κB) був описаний як один з чинників, що пригнічує ER [79]. Він активується за умови впливу на клітину різних подразників, у тому числі цитокінів, наприклад інтерлейкін-1 (ІЛ-1), і стрес-факторів (таких як реактивні форми кисню). ІЛ-1 являє собою цитокін, що виступає у ролі медіатора імунітету і запалення. Він синтезується активованими формами макрофагів та стимульованими В-клітинами. У присутності цього цитокіну NF-κB звільняється від інгібуючого білка ІκB, стає активним і переміщується в ядро, щоб активувати транскрипцію регульованих ним генів. NF-κB може

інгібувати ER шляхом активування інгібіторів та інгібування активаторів транскрипції генів, які кодують ER [80-82].

Узагальнюючи вище зазначене, стає зрозумілим, що РМЗ є поліетіологічним захворюванням, перебіг якого залежить як від впливу на організм екзогенних, так і ендогенних факторів, які можуть виступати, з однієї сторони, ініціюючим фактором канцерогенезу, а з іншої сторони, постійним індуктором прогресування злоякісного процесу в МЗ. Розуміння механізму впливу кожного окремого фактору на пухлинний процес та можливість впливу на нього можуть виступати стримуючим фактором розвитку та існування РМЗ.

### **1.2. Важкі метали і рак молочної залози.**

ВМ – це група хімічних елементів з властивостями металів (у тому числі і напівметали) із значною атомною вагою та щільністю. Відомо близько 40 різних визначень терміну «важкі метали», і неможливо вказати на одне з них, як найбільш прийнятне. Відповідно, список ВМ згідно з різними визначеннями включатиме різні елементи. Вживаним критерієм може бути атомна вага понад 50, і тоді в список потрапляють всі метали, починаючи з ванадія, незалежно від щільності. Іншим часто використовуваним критерієм є щільність, приблизно рівна або більша щільності Fe ( $8 \text{ г/см}^3$ ), тоді в список потрапляють такі елементи як свинець, ртуть, мідь, кадмій, кобальт, а, наприклад, більш легке олово випадає зі списку. Деякі класифікації роблять винятки для благородних і рідкісних металів, не відносячи їх до важких, інші виключають не кольорові метали (залізо, марганець) [83].

Із всіх хімічних елементів періодичної системи Менделєєва, 81 – беруть участь у будові людського організму і різноманітних метаболічних процесах. Виділяють 2 групи мікроелементів (МЕ): есенціальні і токсичні. При нестачі есенціальних МЕ виникають хвороби дефіциту; при різних формах контакту організму людини з токсичними МЕ виникає стан інтоксикації – токсикопатія. Есенціальні МЕ при умові надлишкового

надходження також викликають токсичні ефекти – зниження неспецифічної резистентності, мутагенну та канцерогенну дію. Тому вирішальне значення має рівень концентрації МЕ, форма його сполук, співвідношення з іншими МЕ [84,85].

Зміни МЕ обміну та гомеостазу можуть бути викликані такими факторами, як забруднення навколишнього середовища різними сполуками, вживанням ліків, харчових добавок, спадковими порушеннями обміну МЕ, дієтою [86]. Вплив екологічного забруднення на організм пояснюється тим, що з дитинства до старості людина знаходиться під постійною дією екзогенних органічних і фізичних факторів, в тому числі СВМ [87]. До того ж навіть «здорова» дієта може мати неправильний склад, в залежності від ґрунту, на якому виростили ті чи інші продукти, способу їх приготування, посуду, використання недоброякісної питної води [88].

ВМ залучені в усі життєво-важливі процеси макроорганізму: підтриманні електролітного гомеостазу та кислотно-лужної рівноваги [89,90], перенесенні електронів і активних груп ( $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{O}$ ,  $-\text{S}$ ), окислювально-відновлювальних реакціях, процесах біомінералізації тканин [91-94], поділі клітин [95].

Суттєва зміна концентрації будь-якого іона може бути пов'язана з розвитком серйозної патології. Іони металів відіграють важливу роль у стабілізації ДНК, активації ферментативних реакцій за участю нуклеїнових кислот. При цьому оптимальна швидкість таких реакцій відповідає певним для кожного іона середнім значенням концентрації і зменшується як при зниженні, так і при підвищенні їх вмісту [96,97]. МЕ можуть змінювати структуру нуклеїнових кислот і порушувати процеси передачі генетичної інформації (реплікацію, транскрипцію, трансляцію), викликати одно- та двониткові розриви в ДНК, призводити до генетичних аномалій і пухлинного росту [98,99]. Якщо іони лужних (Na, K) і лужноземельних (Mg, Ca) металів взаємодіють переважно з фосфатними групами ДНК, то іони перехідних металів (Mn, Zn, Co, Ni, Cd, Cu, Hg, Ag) активно зв'язуються з азотистими

основами. Приєднання іонів до фосфатних груп підвищує стабільність ДНК, в той час як зв'язування з азотистими основами знижує температуру переходу спіраль-клубок. У деяких випадках вже при кімнатній температурі подвійна спіраль ДНК розпадається з переходом у клубкоподібний стан [100]. Деякі МЕ, такі як Cu, Hg, Cd навіть при малих концентраціях призводять до локальних ушкоджень ДНК: руйнації подвійної спіралі, зміни її форми, хромосомних аберацій (інверсія в результаті хугстінновського спарювання, поворот основ на  $180^\circ$ ). Інколи вони активують неензимопатичний розрив хімічних зв'язків в ланцюгу нуклеїнових кислот [101].

Зв'язок онкологічних захворювань з дією на організм підвищеної кількості активних радикалів, які виникають під дією ВМ, не викликає сумнівів [15,16]. Активні радикали (продукти перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) і активні форми кисню (АФК)) пошкоджують нуклеотиди, викликаючи мутацію генів, які відповідають за синтез антионкогенних та антиметастатичних протеїнів. Крім того, продукти ПОЛ і АФК викликають активацію онкогенів через пероксидзалежні фактори транскрипції (NF- $\kappa$ B) [102]. СВМ виступають у ролі токсичних МЕ (сюди відносять есенціальні МЕ в токсичних дозах). Їх дія полягає в ослабленні антиоксидантного захисту клітини. Це відбувається в результаті зв'язування іонами металів сульфгідрильних груп глутатіону та ліпоєвої кислоти, тобто сполук, завдяки яким відбувається регенерація і відновлення інших антиоксидантів в організмі (цикл вітамінів Е і С) [100,103]. Токсичні ефекти деяких МЕ обумовлені також антагоністичними відносинами з іншими МЕ, наприклад Cu та Zn можуть витіснятися з комплексних сполук Hg, Cd, Cr, Ni, Pb; надлишок Hg, As, Cd призводить до дефіциту селену; надлишок Pb – до дефіциту Ca і Zn, а Mn – до дефіциту Mg і Cu [104]. Неконтрольоване ПОЛ має ефект "схриньки Пандори": активні радикали пошкоджують біологічні мембрани, структуру нуклеїнових кислот, білкові молекули (ферменти, структурні і транспортні білки) – порушується енергетичний обмін, у багато

разів зростає ризик виникнення злоякісних пухлин, аутоімунних процесів. Пряма дія надлишкової кількості МЕ проявляється в ушкодженні білкових молекул, мембран, нуклеїнових кислот і зміни їх конформації і геометричної структури, маючи наслідком значну або повну втрату фізіологічної активності. Іони ВМ, потрапляючи в цитоплазму, зв'язуються з білками, змінюючи структуру і конформацію молекул, що викликає імунну реакцію (змінені білки розпізнаються як "чужі" – непряма імуногенна дія) [105,106].

Виходячи з вищезазначеного стає зрозумілим, що канцерогенний вплив СВМ реалізується як через механізми порушення структури ДНК своїм безпосереднім впливом на процеси транскрипції, трансляції та реплікації, так і через пригнічення системи антиоксидантного захисту.

Кожен хімічний елемент в окремо-визначений спосіб може впливати на перебіг РМЗ.

#### *Цинк*

Метаболізм цинку (Zn) всередині клітини є багатоетапним процесом, в якому приймають участь біля 24 трансмембранних транспортерів [107,108], які поділяються на дві групи: представники сімейства SLC39A (Zip 1-14) та сімейства SLC30A (ZnT1-10) [109]. Zip транспортери відповідальні за проникнення Zn в цитоплазматичний простір клітини, ZnT1-10 транспортери беруть участь у зменшенні кількості внутрішньо-цитоплазматичного Zn [110].

Нещодавні епідеміологічні дослідження продемонстрували взаємозв'язок між високим рівнем Zn у тканини МЗ і розвитком в ній злоякісного процесу, хоча і вони досить суперечливі [111,112]. Підвищення кількості Zip 6 транспортерів призводить до зниження міцності міжклітинної взаємодії за рахунок зменшення кількості мембранного E-кадгерину, тим самим наділяючи ракові клітини метастазуючим потенціалом [113]; зменшують чутливість клітин РМЗ до антигормональних препаратів [114]. Патологічне збільшення експресії Zip 7 корелює зі стійкістю клітин до тамоксифену та підвищеною експресією HER2/neo [115-117]. Показано вплив

Zip10 транспортеру, вивченого на клітинних лініях MDA-MB-231 і MDA-MB-435S, на метастазуючий потенціал пухлин у лімфатичні вузли та інфільтруючу спроможність РМЗ [118]. Зміна кількості цитоплазматичного Zn блокує каспазу 9, тим самим пригнічує запрограмовану загибель клітини за рахунок виключення мітохондріального шляху активації апоптозу [119,120]. Підвищення кількості пролактину сприяє збільшенню внутрішньоклітинного Zn, за рахунок збільшення кількості Zip6 та Zip10 транспортерів, які виступають синергістами пухлинному росту [120,121]. Тому, призначаючи антагоністи допаміну та підвищуючи рівень пролактину в крові, є загроза порушити метаболізм Zn та спровокувати розвиток онкологічного процесу в МЗ.

Дослідження післяопераційного матеріалу показали значно вищі рівні Zn у пухлинній тканині в порівнянні з нормальною тканиною МЗ. Виявлено високий кореляційний зв'язок між підвищеним рівнем Zn в тканині МЗ і початком розвитку канцерогенезу [122,123]. Експериментальні дослідження з використанням індукованих пухлин МЗ у щурів виявило, що концентрація Zn в пухлинній тканині була у 12 разів вищою, ніж у інтактній тканині самок [124].

Всупереч вищезазначеному, є публікації, в яких перебіг пухлинного процесу ініціюється саме нестачею Zn [125]. Висловлено докази взаємозв'язку між дефіцитом цього МЕ з мутацією гену p53 [126]. Аналіз концентрації сироваткового Zn показав тенденцію до збільшення ризику виникнення РМЗ у людей зі зниженим його рівнем у крові при наявності мутації гену BRCA1 [127]. Сполуки Zn в певній мірі виступають антагоністами по відношенню до інших ВМ, зменшуючи їх токсичність при надходженні останніх в організм людини [128].

### *Залізо*

Окрім впливу заліза (Fe) на фізіологічні процеси макроорганізму дослідження, виконані в останні роки [129,130], показують, що Fe, як і інші ВМ, приймають участь у канцерогенезі МЗ [130]. Аналіз зв'язку між вмістом

у клітинах феропортину (білок, який відповідає за трансмембранний експорт Fe) і РМЗ показав підвищення кількості феропортину в клітинах, уражених злоякісним процесом. Причому, чим агресивніший рак, тим менше в клітинах містилося феропортину, а значить і більше кількості Fe [131,132].

Дисбаланс концентрації Fe розглядається як важливий фактор ризику розвитку РМЗ [133,134]. З однієї сторони, зниження Fe в організмі сприяє розвитку гіпоксії. Це призводить до гіпоксичного каскаду, в якому головну роль відіграє гіпоксичний індукований фактор 1 $\alpha$ , який активує гени, відповідальні за розвиток кровоносних судин, синтезу ендотеліального фактору росту судин, що призводить до утворення нової судинної мережі, яка проникає в пухлину [135-137]. З іншого боку підвищена кількість внутрішньоклітинного Fe каталізує окислювальні реакції, які призводять до утворення АФК та продуктів ПОЛ, які ініціюють зміни ДНК та РНК [138,139], що може виступати етіологічним фактором пухлинного процесу [137,140-142]. Вільні радикали, які утворюються в результаті пероксидазного стресу, допомагають раковим клітинам існувати та ділитися, що призводить до прогресування онкологічного процесу [143,144].

Дослідження, проведені в Нью-Йорському університеті на щурах показують, що в групі тварин з залізодефіцитною дієтою більший ризик утворення РМЗ у порівнянні з щурами, які отримували достатню кількість Fe. Вчені стверджують, що зменшення Fe призводить до пригнічення експресії рецепторів E-кадгерину, підсиленню ангіогенезу [145]. Порівнюючи дані з дослідженнями у людей [146], виявлена закономірна більш агресивна форма перебігу РМЗ при дефіцитному стані Fe та рекомендоване вживання препаратів Fe з метою корекції дисбалансу [145,147].

В інших дослідженнях на щурах, яких годували надмірною кількістю Fe, було виявлено значне збільшення кількості карцином МЗ. Крім того, дослідження виявили, що клітини РМЗ за умови надлишку Fe мали більший інвазивний і метастатичний потенціал [148]. У дослідженні на хворих, які мали мутацію гену трансферину, ризик розвитку РМЗ збільшений на 7,3 рази

[149]. При обстеженні жінок, які хворіли гемохроматозом, що характеризується накопиченням в організмі Fe, виявлено, що у них виявлялась схильність до розвитку РМЗ за рахунок відкладання Fe у тканині МЗ [150,151].

### *Свинець*

Добре відомо, що свинець (Pb) чинить на організм людини виражену канцерогенну та тератогенну дію. Для металу характерне швидке накопичення і повільне виведення [152-156]. Токсичний ефект Pb обумовлений здатністю утворювати ковалентні зв'язки з багатьма аніонами-лігандами, до яких належать сульфгідрильні групи, похідні цистеїну, карбоксильні групи білків і ферментів, що призводить до їх руйнування. Серед численних «мішеней» Pb особливе місце займають антиоксидантні системи з можливістю утворення вільних радикалів, які загрожують пошкодженням геному і мембрані клітин [157]. У дослідженнях на тваринах було встановлено, що Pb, який надходить у високій концентрації з кормом, викликає рак нирок. На цій основі Pb і його неорганічні сполуки віднесено до класу можливих канцерогенів для людини [158]. Проведене дослідження впливу свинцевої інтоксикації на мембрану клітин МЗ лактуючих щурів показало, що інтоксикація солями Pb призводить до пошкодження клітинних мембран МЗ, підвищенню їх чутливості до індукованого ПОЛ [159].

Результати епідеміологічних досліджень, що вивчали зв'язок впливу Pb та розвиток РМЗ, варіюють в залежності від типу пухлинного процесу [160]. Здатність Pb функціонувати як сильнодіючий «естрогеноподібний каталізатор» може бути важливим фактором ендокринних розладів [161]. Дослідження тканини МЗ жінок, хворих на рак та на доброякісні пухлинні процеси, виявило значно більшу кількість Pb в тканині злоякісної пухлини. Більш того, кількість Pb в тканині доброякісних пухлин була вищою за кількість його в нормальній тканині МЗ [162].

### *Мідь*

Мідь (Cu), при його підвищеній кількості, може легко переходити з однієї валентності в іншу ( $\text{Cu}^+ - \text{Cu}^{2+}$ ), ініціюючи тим самим вільно-радикальні реакції окислення, в першу чергу ПОЛ, що приводить до утворення АФК [163,164].

Cu є важливим кофактором ангиогенезу. Численними дослідженнями доведено, що інтенсивність ангиогенезу прямо або опосередковано залежить від рівня Cu в організмі [165]. Мідь-зв'язані молекули не є ангиогенними, хоча звільнена з комплексу мідь набуває ростових властивостей [166,167].

Рівень сироваткової міді та її вміст у пухлинній тканині значно підвищений у хворих з різними видами злоякісного процесу в багатьох органах [168,169]. Нещодавні дослідження з визначення вмісту Cu в пухлинній тканині МЗ виявили більш високі концентрації мікроелементу в порівнянні з нормальною тканиною [170]. Блокуючи потрапляння Cu в ракові клітини, можна нівелювати їх метастатичний потенціал, тим самим продовжити життя онкохворих. Саме за допомогою використання тетратиомолібдату (препарату комплексоутворення міді, який використовується у пацієнтів з хворобою Вільсона) на протязі багатьох років достовірно підтверджена гіпотеза синергічної взаємодії Cu з онкопроцесом МЗ – жінки, які отримували тетратиомолібдат мали довшу виживаність та більший безметастазний період [171-173], зменшувалась експресія фактору росту ендотелію судин [174-176].

### *Хром*

Металевий хром (Cr) нетоксичний, а розчинні його сполуки – отруйні. Є дані про те, що сполуки Cr (VI) мають канцерогенну дію [177,178]. Здатність Cr зв'язуватися з білками і нуклеїновими кислотами доведена роботами Gennete K. [179]. Автор висловлює припущення про те, що він, беручи участь у стабілізації структури нуклеїнових кислот, може впливати на передачу генетичної інформації. Впливаючи на процеси транскрипції і трансляції, Cr безпосередньо бере участь у регуляції синтезу і розпаду нуклеїнових кислот, тим самим визначаючи експресію геному.

При обстеженні 26 хворих на РМЗ та 29 здорових жінок виявили статистично достовірну різницю в кількості Cr у волоссі. Тому кількість Cr у волоссі (підвищення його кількості) рекомендовано визначати з метою встановлення фактору ризику щодо захворюваності на рак [180]. Вчені Дартмунського університету повідомили про можливість піколінату Cr (харчової добавки) накопичуватись всередині клітин і приймати участь в розщепленні ДНК. Надходження з питною водою різних доз шестивалентного Cr показало наявність прямопропорційної залежності між дозою і накопиченням цього мікроелемента у внутрішніх органах. Дослідники Алабами виявили, що піколінат Cr поводить себе в біохімічних реакціях, як вітамін С. Вони показали, що він каталізує окиснювальні реакції, стимулюючи утворення потенційно-небезпечних щодо мутагенного ушкодження ДНК вільних радикалів [181].

### *Нікель*

Незначна кількість нікелю (Ni) нетоксична [182]. Збільшення впливу сполук Ni, через його більш широке використання в промислових процесах, веде до збільшення випадків розвитку РМЗ [183,184]. Справді, деякі сполуки Ni, були визнані канцерогенними в IARC з 1970 року. Недавнє дослідження показало більш високі його рівні в тканині РМЗ ніж у здоровій МЗ [185-188], що вказує на участь підвищеного рівня Ni на розвиток злоякісного процесу.

ВМ, в тому числі і Ni, виступаючи в якості металоестрогенів, можуть функціонувати як ендокринні дестабілізатори, впливаючи на нормальний гормональний фон і змінюючи розвиток МЗ через класичні та некласичні естрогензалежні шляхи регулювання життєдіяльності клітин [189-191]. Підвищене надходження солей Ni показало свій канцерогенний потенціал на тваринах [192]. У дослідженнях *in vitro* встановлена можливість блокувати зв'язування естрадіолу з ER [193,194]. Підвищена кількість Ni в організмі може впливати на ДНК, призводячи до різних варіантів його епігенетичних змін (метилування, ацетилювання та інші) [195-199]. Підвищена кількість металу може призвести до більшої конденсації хроматину, сприяючи

утворенню гетерохроматину в критичних частинах ДНК, що містять гени пухлинних супресорів [200,201]. Впливаючи на метилювання p53 і p16 промоторів, він бере участь у регулюванні апоптозу [202-204]. Ni, накопичуючись в різних регіонах гетерохроматину, може індукувати окисне пошкодження ДНК, додатково порушуючи експресію генів та сприяючи канцерогенезу [201,205]. Кілька досліджень показали можливість стимулювання анеуплоїдії за участі VM [206,207].

Не можна виключити роль СВМ у патологічній мінералізації тканини РМЗ, враховуючи їх здатність вступати у ковалентні зв'язки з молекулами солей кальцію [208,209]. Розглядається можливість їхньої участі не тільки в прогресуванні мінералізації, а й в ініціації цього процесу [71,210]. Це питання найбільш гостро стоїть у тих регіонах країни, де простежується тенденція до підвищення забруднення довкілля СВМ.

Аналізуючи доступну наукову літературу, можна зробити висновок про наявність протиріч у розумінні впливу СВМ на тканину МЗ. Узагальнюючи вищезазначене, можна стверджувати, що СВМ при їх надмірному надходженні до організму, знаходять своє місце в ініціюванні та прогресуванні пухлинних процесів МЗ. Це стосується як можливості впливу на рецепторний статус клітин так і зміни мікрооточення пухлини. Залишається відкритим питання можливості стимулювати пухлинний процес при комбінованому підвищеному надходженні СВМ до організму жінок. На сьогоднішній день нез'ясованими є ключові патогенетичні ланки їхнього впливу на морфогенез РМЗ.

### **1.3. Характеристика рецепторів тканини раку молочної залози.**

Рецепторний статус пухлинних клітин виступає одним з найпотужніших прогностичних і терапевтичних маркерів. Від наявності рецепторів та ступеню їхньої експресії залежить вид медикаментозного лікування та агресивність перебігу неопластичного процесу.

*Рецептори до естрогену (ER) та прогестерону (PR)*

ER та PR опосередковують дію стероїдних гормонів [211]. Є дві різні форми ER: ER $\alpha$  і ER $\beta$ , кожен з яких кодується окремим геном (ESR1 і ESR2, відповідно). ESR 1 локалізується на 6-ій хромосомі, а ESR2 – на 14-ій [212-214]. З'єднання гормону з рецепторами викликає дисоціацію комплексу з рецепторним білком (шаперон 90), який перешкоджає переходу рецептора в активний конформаційний стан [215]. Потім, в якості гетеродимеру рецептора, він взаємодіє з елементом відповіді естрогену, збільшуючи експресію генів, які приймають участь у клітинному циклі, диференціюванні, міграції, проліферації та апоптозі клітин, біосинтезі білка, адаптації клітини при зміні метаболічних умов [213,215]. PR активується прогестероном. Ген, який кодує PR, розташований на 11-ій хромосомі. PR синтезується після ER [216]. Їх кількість збільшується із зростанням кількості естрадіолу та ER, та вони є індикатором їх функціональної активності [217,218].

У нормі в епітелії МЗ спостерігається невисока експресія ER та PR (7%-30% клітин), тоді як при пухлинній трансформації значно підвищується експресія обох маркерів, що корелює з гістологічним диференціюванням пухлини та чутливістю до гормональної терапії [219,220]. Статус ER та PR пухлини МЗ визнаний одним з найбільш потужних прогностичних маркерів [221,222]. У випадку стероїд-позитивного варіанту РМЗ, останній – є керованим і контрольованим антиестрогенними препаратами [223,224]. Ступінь експресії рецепторів до стероїдних гормонів зворотно пропорційний ступеню анеуплоїдії ракових клітин [221]. При ER+ статусі пухлини її чутливість до терапії складає 55-60%, тоді як при ER+/PR+ статусі – 80% [225]. Якість відповіді на лікування залежить не тільки від факту наявності стероїд-позитивних клітин, а і від їх кількості [226].

Ряд хімічних речовин у навколишньому середовищі показали естрогеноподібну активність, у тому числі і СВМ [189,190]. Вони формують «новий клас ендокринної системи» і можуть впливати на стероїд-чутливі клітини [227,228].

*Рецептори 2-го типу людського епідермального фактору росту (HER2/neu)*

HER2/neu є найбільш вивченим геном сімейства рецепторів епідермального фактора росту [229,230]. Ген ERBB2 (ген, що кодує HER2/neu), відомий як протоонкоген, розташований на довгому плечі 17-ої хромосоми [231]. HER2/neu локалізується на мембранах клітин та, після зв'язування з лігандами, активує фосфотрансферази, а ініційована внутрішня тирозинкіназа конформаційно зміненого рецептора запускає реакції фосфорилування білків, які беруть участь у передачі мітогенних сигналів [232].

Підступність цього білка полягає не тільки в здатності стимулювати пухлину до самозростання, але також у залученні стромі в експресію рецепторів до самого фактору з наступною "опосередкованою" індукцією пухлинного росту (так званий "подвійний" механізм пухлинної прогресії) [232]. При HER2/neu+ статусі 5-річне виживання становить 56%, при негативному – 73%. Експресія HER2/neu свідчить про резистентність пухлини до хіміотерапії, в тому числі до тамоксифену, агресивність перебігу РМЗ [222,233]. У дослідженнях деяких авторів показано протилежні рівні експресії в тканині РМЗ стероїдних рецепторів та HER2/neu, що вказує на різну спрямованість лікування злоякісного процесу за наявності тих або інших рецепторів [234-236].

*Ki-67*

Ki-67 – маркер проліферативного потенціалу пухлини, що кодується геном, який розташований на 10-ій хромосомі. Він є універсальним індикатором проліферації клітин як нормальної, так і пухлинної тканини [237,238]. Антиген Ki-67 являє собою короткоживучих протеїн, він руйнується протягом 1,5-2 годин. Тому, антитіла до Ki-67 виявляють тільки клітини, що знаходяться в стані поділу, тому як Ki-67 не встигає накопичуватися і не залишається у клітинах в стані спокою [239].

Ступінь диференціювання і злоякісності РМЗ багато в чому визначається проліферативною активністю пухлинних клітин. Вивчення негістонового протеїну Ki-67, який експресується всіма клітинами, що вийшли з G<sub>0</sub>-фази, є актуальною проблемою і дозволяє визначити саме "прихований" проліферативний потенціал даної пухлини і оцінити ступінь її злоякісності, а також розділити пацієнтів на групи з відносно сприятливим і несприятливим перебігом [222]. Більш того, саме на підставі рівня експресії рецепторів Ki-67 деякі вчені показують різницю між люмінальним типом А та люмінальним типом В (HER2/neu негативний варіант) РМЗ, вважаючи значення 14% як перехідне між цими двома молекулярно-генетичними видами неоплазій [240-242].

### *p53*

У літературі описано 2 види p53-протеїну: "дикий" (wild type – wt p53) та «мутантний» (mutant type – mt p53) типи [244]. У разі пошкодження ДНК wt p53, підвищуючи кількість p21<sup>Waf1/Cip1</sup> та пригнічуючи функцію комплексу циклін В/Cdc2, блокує клітинний поділ на рівні G<sub>1</sub> та G<sub>2</sub> фаз відповідно [245]. Якщо відновити ДНК не вдається, то p53 запускає в клітині механізми апоптозу, стимулюючи транскрипцію проапоптозних генів, включаючи bax і fas, та блокуючи експресію антиапоптозних генів (bcl-2), що призводить до захисту організму від клітин, здатних до злоякісної трансформації [244,246].

Синтез mt p53 є одним з "стратегічних" рішень пухлинної тканини, який імітує властивості wt p53 і таким чином виходить з-під впливу системи імунного захисту [247]. До втрати супресорних властивостей можуть призводити різні зміни в геномі – делеції, реверсії, точкові мутації [248,249]. При цьому за рахунок супресорної дії wt p53 нівелюється патологічним mt 53.

Набуті мутації в гені TP53, що розташований на 17-ій хромосомі, спостерігаються приблизно у 50% злоякісних пухлин [249,250]. Патологічний p53 присутній у 18%-25% випадках РМЗ [248,251]. Його надлишкова експресія корелює з негативним гормональним статусом пухлини та

HER2/neu+ підтипом РМЗ [252]. Функціональна інактивація p53 пов'язана з ранніми рецидивами, гіршим перебігом та стійкістю до хіміотерапії [248,249,251].

### *Bcl-2*

Bcl-2 ген локалізується на 18-ій хромосомі і відіграє важливу роль у визначенні, чи буде клітина необоротно схильна до апоптозу [253,254]. Він інгібує внутрішній шлях активації апоптозу за рахунок запобігання виходу цитохрому С з мегаканалів («гігантських пор») мітохондрій і/або за рахунок зв'язування фактора, активації апоптозу – APAF1 [255]. Відомо, що транскрипція гену Bcl-2 активується за допомогою сигналів, одержаних від ER [256], тому bcl-2+ статус майже у 100% супроводжується наявністю ER [254,257].

Bcl-2+ статус РМЗ корелює з наявністю рецепторів до стероїдних гормонів, низьким ступенем злякисності, чутливістю до тамоксифену та сприятливим варіантом перебігу злякисного процесу [254,257,258]. Він може виступати незалежним прогностичним фактором при РМЗ, хоча ці дані в літературі суперечливі [259,260].

### *Остеопонтін*

Остеопонтін (OPN) – це багатофункціональний протеїн, який бере участь не тільки в процесах реконструкції кісткової тканини, а й займає важливе місце в продукції цитокінів, регулюванні клітинної міграції, адгезії і диференціюванні макрофагів, ендотеліоцитів, гладком'язових клітин, лімфоцитів і фібробластів, а також проявляє про- і протизапальні властивості [261]. Концентрація OPN істотно зростає при пухлинному рості, метастазуванні, атеросклерозі, інфаркті міокарда, інсульті та інших патологічних станах [262-264].

Вивчення експресії OPN в пухлинах МЗ продемонстровано в багатьох дослідженнях. Висловлюється припущення про те, що ступінь експресії OPN збільшується з підвищенням ступеня злякисності пухлини [265,266]. Дослідивши пухлини МЗ у 141 пацієнток, виявили, що ступінь експресії OPN

корелює з частотою виявлення кальцинатів під час мамографії та гістологічному дослідженні препаратів [267]. Показано, що експресії OPN в тканині РМЗ корелює зі ступенем злоякісності пухлини, прогресуванням неоплазії, відсутністю чутливості до антигормональної терапії, скороченням виживання [268,269]. Є відомості про можливість інгібування OPN, і як наслідок, уповільнення або припинення пухлинного росту [270].

#### *Білок теплового шоку 90*

Білки теплового шоку, шаперони (heat shock proteins – hsp) полегшують формування вторинної та третинної структури білків, беруть участь у процесах репарації або елімінації неправильно згорнутих або денатурованих білків [271,272]. Їх синтез індукується підвищенням температури, додаванням до клітин органічних розчинників, ВМ, сильних оксидантів, під впливом деяких гормонів і ростових факторів [273]. Відомо кілька груп шаперонів, об'єднаних в сімейства залежно від їх молекулярної маси: HSPH (hsp110), HSPC (hsp90), HSPA (hsp70), DNAJ (hsp40), сімейство малих HSPB (sHSP м.м. 25/27 кДа, 22 і 20 кДа), а також сімейство шаперонинів HSPD/E (hsp60/hsp10) [271]. Багато досліджень показало явище перехресної резистентності, в якому деякі шкідливі речовини (оксидазний стрес, вплив різних видів випромінювання, іони ВМ, запальний процес) викликають індукцію синтезу hsp і адаптивну відповідь до інших факторів [274,275].

Hsp90 відповідає за конформаційне дозрівання і репарацію більше 300 внутрішньоклітинних білків, які відіграють важливу роль у рості, диференціюванні та дозріванні клітин. З них більше 40 складають білки, що сприяють включенню клітин у проліферативний цикл: HER2/neu, Braf, Akt/PKB, mt p53, транскрипційні фактори, ангіогенний фактор HIF-1 $\alpha$ , теломераза і т.д [276-279]. Hsp90 сприяє активації антиапоптотичних протеїнкіназ та блокує білок внутрішнього шляху апоптозу APAF-1, тим самим підтримує стійкість клітин перед розвитком їх запрограмованої загибелі [280,281]. Цей шаперон регулює активність факторів Акт, NF- $\kappa$ B і

JKN [282], сприяє процесу інвазії за допомогою матриксних металопротеїназ [283].

*Матриксна металопротеїназа 1 та E-кадгерин*

Свою назву матриксні металопротеїнази (matrix metalloproteinases – MMP) отримали з-за можливості специфічно гідролізувати основні білки екстраклітинного матриксу. Вони відносяться до сімейства цинквмісних металопротеїназ, маючи в активному центрі  $Zn^{2+}$  [284,285]. Деградація позаклітинного матриксу за допомогою MMP є важливим процесом у багатьох випадках, включаючи розвиток та ріст тканин, процес ангиогенезу, а також при патологічних процесах, в яких вони виступають модуляторами пухлинної інвазії [286,287]. Група MMP у даний час складається з 24 білків, які в сукупності здатні розщеплювати всі компоненти екстрацелюлярного матриксу [288,289].

MMP1 приймає участь у нормальному функціонуванні тканин, маючи виражену колагеназну активність [290]. Наявність цього протеїну асоційована з багатьма патологічними станами, включаючи РМЗ [291-293]. MMP1, за рахунок колагеназної активності, розщеплює екстрацелюлярний матрикс пухлини, надаючи можливостей до місцевого та внутрішньосудинного поширення неопластичних клітин [285,294]. Експресія MMP1 пухлинними клітинами вказує на підвищення метастатичного потенціалу, зменшення міжклітинної взаємодії, скорочення виживання пацієнтів [291,292].

E-кадгерин – це мембранний білок, глікопротеїн з родини кадгеринів, продукт експресії гена CDH1 [295,296]. Він бере участь у гомофільних взаємодіях, утворюючи міжклітинні контакти. E-кадгерин залучений у механізми регуляції міжклітинної адгезії, клітинної рухливості і проліферації епітеліальних клітин, відіграє потенційну антагоністичну роль у здатності клітин до інвазії [297,298]. Пригнічення або втрата функції гена, кодуючого білок адгезії, асоційовано з інвазивним і агресивним фенотипом різних типів пухлин людини, можливості пухлин до метастазування [299-301].

*O<sup>6</sup>-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза*

*O<sup>6</sup>-метилгуанін-ДНК-метилтрансфераза* (*O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase – MGMT*), ген якої знаходиться на 10-ій хромосомі, усуває пошкодження ДНК алкілувальними речовинами, нівелюючи їх цитотоксичний ефект [302,303]. Розпізнавальна послідовність протеїну, яка знаходиться в його меншій канавці, поєднується з пошкодженою нуклеїновою кислотою (метильованою ДНК) і, не змінюючи структури останньої, забирає алкільний залишок [304]. Утворена в результаті цього інактивована MGMT може вступати у взаємозв'язок з рецепторами до стероїдних гормонів, пригнічуючи їх функцію, тим самим блокуючи передачу сигналів до поділу клітин [305]. Є відомості про інгібуючий вплив СВМ на активність MGMT [299].

Встановлено негативний кореляційний зв'язок між експресіями MGMT та p53 в тканині РМЗ [307]. У дослідженнях окремих авторів показано, що кількість MGMT в пухлинних клітинах може як збільшуватись, демонструючи стійкість РМЗ перед хіміопрепаратами [308], так і зменшуватись (за рахунок метилювання промотору MGMT), надаючи можливість раковим клітинам вступати в апоптоз [309]. Проведений аналіз експресії прогностичних рецепторів показує, що MGMT+ статус тканини корелює з виявленням люмінальних молекулярно-генетичних варіантів РМЗ та низьким рівнем проліферативної активності клітин [310]. Запропоновано розглядати рівень експресії MGMT як окремий прогностичний фактор перебігу злякисного процесу в МЗ [309,310].

*Фактор росту ендотелію судин*

Фактор росту ендотелію судин (*vascular endothelial growth factor – VEGF*) – це сигнальний білок, що виробляється клітинами з метою стимуляції васкулогенезу (утворення ембріональної судинної системи) і ангіогенезу (ріст нових судин у вже існуючій судинній системі) [311]. Білки VEGF виступають частиною системи, що відповідає за відновлення подачі кисню до тканин в ситуації, коли циркуляція крові недостатня [312].

Рівень VEGF корелює з несприятливим перебігом РМЗ. Численні дослідження вказують на погіршення прогнозу при надмірній експресії VEGF [313]. Надекспресія VEGF може бути першим кроком у процесі метастазування – кроком, який включає «ангіогенний» перемикач [314]. До переліку функцій VEGF також входить: сприяння у формуванні лімфатичних судин, стимуляція важливих для ангіогенезу факторів, включаючи антиапоптозні білки, молекули клітинної адгезії і металопротеїнази [315,316].

Слід зазначити, що в процесі прогресування РМЗ рецепторний статус пухлинних клітин може неодноразово змінюватись. Це залежить від виникнення мутацій генів, блокування рецепторів гомологічними до їх паратопу речовинами (епітоп яких відповідає будові фізіологічних стимуляторів), зміни навколопухлинного мікросередовища, проведення протипухлинної терапії.

#### *Фрагментація та метилювання ДНК*

Однією з ознак апоптозу є фрагментація ДНК, яка відбувається по нижче перерахованим етапам. На першому етапі ДНК фрагментується на великі частини, які складаються з декількох мільйонів пар основ (bp) в довжину. На другому – 50000-300000bp. Третій етап являє собою фрагментацію ДНК на окремі нуклеосоми або полінуклеосоми (200-1000bp) [317]. Існує інший механізм поділу генетичного матеріалу на фрагменти – це відсутність проапоптозного блоку, в результаті чого при поділі утворюються все менші фрагменти ДНК. Причин пошкодження ДНК було вивчено багато, але найбільш важливими з них є пряме пошкодження ДНК активними формами кисню або швидка активація нуклеаз у процесі апоптозу, в які залучені VM [101,179,318].

Метилювання ДНК (приєднання метильної групи до азотистих основ) – це модифікація молекули ДНК без зміни самої нуклеотидної її послідовності, що можна розглядати як частину епігенетичного складового геному [319,320]. У людини метильовано близько 1% геномної ДНК. Процес

метилування генів та їх промоторів може виступати як ініціатором їх транскрипції, так і супресором. Мовчання генів-супресорів пухлинного росту шляхом метилування ДНК являє собою потужний молекулярний механізм, за допомогою якого метилування ДНК може ініціювати рак, а також дає обґрунтування терапії, спрямованої на інгібування метилування ДНК, і повторного активування заблокованих генів-супресорів пухлини [321-323].

Описано значну кореляцію між рівнем метилування ДНК і експресією ключових генів РМЗ, таких як МУС, TERT, TP63 та інші [324,325]. Рівень експресії стероїдних рецепторів також залежить від стану кодуючого його гену (метильований він чи ні) [326]. Тим не менш, гіпометилування не менш важливе, тому що критичні гени росту і метастазування є гіпометильованими при раку [327,328]. Деметилування ДНК відіграє важливу роль у розвитку раку, повертаючи до експресії прометастатичний ген MMP [329].

Аналізуючи участь рецепторів та зміни ДНК в морфогенезі РМЗ, можна зробити висновок, що вони безпосередньо впливають на перебіг злякисного процесу в МЗ як за рахунок дестабілізації проліферативно-апоптичного регулювання клітин, так і за рахунок впливу на поширення, метастазування, зниження чутливості до терапії клітин РМЗ.

Підсумовуючи результати огляду літератури за темою наукового дослідження слід відмітити наступне:

1. рак молочної залози є досить поширеною онкологічною патологією жіночого населення;
2. солі важких металів у більшій своїй частині мають негативний вплив на процеси канцерогенезу;
3. детальні механізми розвитку та морфогенезу раку молочної залози за умов дії на організм солей важких металів у літературі не вивчені;
4. з урахуванням рецепторного статусу тканини раку молочної залози є можливість розкрити особливості виникнення та трансформації неоплазії молочної залози за умов комбінованого впливу солей важких металів.

Аналізуючи пошуковий матеріал, також залишається відкритим питання комбінованого впливу ВМ на морфогенез ППМЗ, їх участь у дестабілізації генетичного матеріалу, змін рецепторного профілю неоплазій МЗ, які залежать від кількості ВМ у раковій тканині, що і послугувало ціллю наших подальших досліджень.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Дисертаційна робота виконана в Сумському державному університеті на кафедрі патологічної анатомії. Клінічною базою слугував Сумський обласний клінічний онкологічний диспансер.

#### **2.1. Скринінгове дослідження.**

Популяційна частота та структура чинників ризику розвитку РМЗ в екологічно несприятливому довкіллі півночі Сумщини вивчена шляхом ретроспективного дослідження гістологічних препаратів захворювань МЗ упродовж 2004-2014 рр. Проаналізована екологічна ситуація у Сумській області за останні 10 років на підставі вивчення звітів управління екологічної безпеки у Сумській області, результатів Новомосковської екологічної експедиції у Сумській області, за даними обласної і міських санітарно-епідеміологічних служб на наявність шкідливих забруднюючих чинників у навколишньому середовищі у вигляді СВМ. На підставі цих результатів до «екологічно-забруднених» регіонів віднесено Середино-Будський, Шосткинський та Ямпільський райони, де відмічається підвищена кількість солей Zn, Fe, Cu, Ni, Pb та Cr. Найбільш сприятлива екологічна ситуація щодо вмісту СВМ спостерігається у Краснопільському, Тростянецькому та Велико-Писарівському районах.

Основою проведеної роботи стало ретроспективне морфологічне дослідження 94 випадків інфільтративного протокового раку молочної залози. Тканина, отримана після операційного втручання в період з 2012 по 2015 роки (54 – радикальна резекція за Маденом, 8 – радикальна резекція за Пейті, 6 – радикальна резекція за Холстедом та 26 – секторальна резекція МЗ), 10 випадків МЗ без ураження онкологічним процесом та тканина метастазів РМЗ у лімфатичні вузли.

## 2.2. Гістологічне дослідження тканини молочної залози.

Матеріалом дослідження стала тканина ІІРМЗ. Весь матеріал був розподілений на 2 групи. У першу групу увійшов матеріал від жінок, які мешкають у «екологічно-забруднених» районах Сумської області – 61 випадок. Другу групу порівняння склав біопсійний матеріал від хворих з «екологічно-чистих» районів – 33 випадки.

Особливого значення надавалось вивченню епідеміологічного анамнезу із зазначенням постійності проживання жінок на вищезазначених територіях.

Макроскопічне дослідження біопсійного матеріалу проводилося протягом 5 годин після оперативного втручання. Вимірювались розміри пухлини, наявність інвазії у навколишні тканини, виявлялися вторинні зміни у вигляді біомінералізації, ослизнення, некрозів. Для гістологічного дослідження брали кусочки розміром  $1,0 \times 0,5 \times 0,5$  см з центральної та периферичної зони новоутворення. Матеріал підлягав фіксуванню у 10% нейтральному забуференому розчині формаліну ( $\text{pH}=7,0-7,2$ ) протягом доби з наступним зневодненням і заливанням парафіном у апараті карусельного типу «ТМ-4М». Другу частину матеріалу зберігали в холодильній камері при температурі  $-10^{\circ}\text{C}$  до встановлення гістологічного діагнозу.

Гістологічне дослідження проводилося на депарафінованих зрізах завтовшки  $7 \times 10^{-6}$  м, які забарвлювалися гематоксиліном та еозином за стандартною методикою. Оцінювали як характеристики паренхіматозного компоненту пухлини (формування залозистих та тубулярних структур, клітинний поліморфізм, кількість мітозів, вихід пухлини за межі базальної мембрани), так і якісний склад мікрооточення пухлини.

Пухлини класифікували за різними ступенями диференціювання згідно рекомендацій С.W. Elston та I.O. Ellis, яка враховує здатність неоплазії формувати тубулярно-залозисті структури, ступінь ядерного поліморфізму та кількість мітозів [62].

Гістохімічна реакція з метою виявлення петрифікації МЗ проводилася алізариним червоним S.

### 2.3. Імуногістохімічне дослідження тканини раку молочної залози.

Матеріалом для дослідження слугували парафінові блоки з тканиною ШРМЗ.

Для проведення імуногістохімічного (ІГХ) дослідження виготовляли зрізи завтовшки  $5 \times 10^{-6}$  м, які підлягали стандартній депарафінації та зневодненню у ксилолі та спиртах у зростаючих концентраціях. Демаскування антигенів проходили в водяній бані «ВБ-4» при температурі 97-98°C. Реакція антиген-антитіло була візуалізована з використанням системи детекції «UltraVision Quanto Detection System HRP DAB Chromogen» («Thermo scientific», США), яка включала блокування ендогенної активності пероксидази перекисем водню, блокування неспецифічного фонового забарвлення з використанням «Ultra V block», посилення реакції «Primary Antibody Amplifier Quanto» та кінцева візуалізація діамінобензидином (ДАБ) з дозabarвленням ядер гематоксиліном Маєра.

У дослідженнях використана наступна панель антитіл («Thermo scientific», США) (табл. 2.1):

- для визначення експресії рецепторів статевих гормонів моноклональні кролячі антитіла до білка естрогену (клон SP1) та прогестерону (клон YR85). Оцінку експресії ER та PR проводили згідно рекомендацій D.C.Allred з урахуванням частки забарвлених ядер та інтенсивності їх забарвлення. Вважали негативною реакцією, коли сума балів складала 0-2, слабопозитивною – 3-4 бали, позитивною – 5-6 балів і сильнопозитивною – 7-8 балів [330];
- для визначення онкопротеїну HER2/neu використовували моноклональні кролячі антитіла (клон SP3), з урахуванням повноти та інтенсивності забарвлення мембрани [331]. У випадку сумнівної реакції (2+) матеріал підлягав дослідженню за допомогою флуоресцентної *in situ* гібридизації (fluorescent *in situ* hybridization – FISH) з встановленням остаточного HER/neu профілю пухлини;

- для вивчення особливостей апоптозу і порушення в системі репарації ДНК пухлинних клітин використано мишині моноклональні антитіла до рецепторів bcl-2 (клон 100/D5) та p53 (клон SP5);

Таблиця 2.1

## Панель антитіл для ІГХ дослідження

Антитіло	Імунізована тварина	Клон	Розведення	Локалізація в клітині
ER $\alpha$	Кролик	SP1	1:200	Ядро
PR	Кролик	YR85	1:150	Ядро
HER2/neu	Кролик	SP3	1:100	Мембрана
E-cadherin	Кролик	67A4	1:100	Мембрана
Hsp90 $\alpha$	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма та ядро
Bcl-2	Миша	100/D5	1:100	Цитоплазма
CD3	Кролик	SP7	1:150	Мембрана
CD79 $\alpha$	Кролик	SP18	1:200	Мембрана
S100	Миша	4C4.9	1:150	Цитоплазма
MPO	Кролик	Поліклон	1:100	Цитоплазма
P53	Миша	SP5	1:100	Ядро
Ki-67	Кролик	SP6	1:100	Ядро
MGMT	Миша	MT 3.1	1:50	Цитоплазма та ядро
VEGF	Кролик	Поліклон	1:200	Цитоплазма та мембрана
MMP1	Кролик	Поліклон	1:50	Цитоплазма
OPN	Кролик	Поліклон	1:100	Цитоплазма

- для вивчення проліферативної активності ракових клітин – кролячі моноклональні антитіла до білка Ki-67 (клон SP6);
- моноклональні кролячі антитіла до E-кадгерину (клон 67A4) використані з метою диференційної діагностики високого ступеню злоякісності

ІПРМЗ та інфільтративного часточкового РМЗ. Позитивна реакція вказувала на приналежність пухлини до групи ІПРМЗ. Вони слугували також маркером адгезивних властивостей ракових клітин;

- для вивчення деметилювальних можливостей клітин та конформаційного підтримання внутрішньоклітинних білків використано кролячі моноклональні антитіла до білків MGMT (клон МТ3.1) та мишині поліклональні антитіла до білка hsp90 $\alpha$ ;
- особливості мінералізації тканини РМЗ досліджували з використанням кролячих поліклональних антитіл до білка OPN;
- для встановлення аутогенної стимуляції ангіогенезу вивчали експресію рецепторів VEGF з використанням поліклональних кролячих антитіл;
- поліклональні кролячі антитіла до білка MMP1 слугували показником інвазивної спроможності клітин;
- якісний склад імунного мікрооточенні пухлини досліджено за допомогою антитіл до CD3 (маркер популяції Т-лімфоцитів), CD79 $\alpha$  (маркер В-лімфоцитів), S100 (маркер антиген-презентуючих макрофагів) та до білка мієлопероксидаза (маркер нейтрофільних і еозинофільних гранулоцитів).

Ступінь експресії рецепторів MMP1, E-кадгерину, VEGF, OPN, hsp90 $\alpha$ , MGMT, Ki-67, p53 та bcl-2 оцінювали за напівкількісним методом, вважаючи реакцію в 1 бал негативною, 2 бали – слабопозитивною, 3 бали – помірнопозитивною та 4 бали – сильнопозитивною.

В якості контролю якості проведеного ІГХ дослідження проводили активний (використання тканини, з попередньо встановленою позитивною та негативною реакцією) та пасивний контроль отриманих результатів.

#### **2.4. Визначення хімічного складу тканини раку молочної залози.**

Тканина, збережена в холодильній камері, підлягала розморожуванню з подальшим вивченням її хімічного складу за допомогою атомної

спектрофотометрії в Лабораторії атомно-абсорбційного аналізу Центру морфологічних досліджень СумДУ. Зразки тканини зважували з точністю до 0,001г. Потім їх спалювали в муфельній печі при температурі 450<sup>0</sup>С для видалення органічної матриці. Отриманий попіл розчиняли в суміші соляної (2мл) та азотної (1мл) кислот та доводили об'єм розчину до 10мл бі-дистильованою водою. Отриманий розчин аналізували на спектрофотометрі С115-01 із полуменевим та електротермічним атомізатором. Вибір методу атомізації ґрунтувався на концентрації елемента в розчині. Перед визначенням кожного елемента будували калібрувальний графік, використовуючи стандартні розчини елементів (ГСОРМ). Вміст кожного МЕ вимірювався за певної довжини хвилі: Zn – 213,9нм, Cu – 324,7нм, Pb – 283,3нм, Cr – 357,9нм, Fe – 248,3нм та Ni – 240,7нм. При калібруванні використовували не менше чотирьох відомих концентрацій. Після проведення процедури визначення вмісту елемента в розчині вводили масу зразка та отримували концентрацію елемента в 1 грамі досліджуваної тканини. Проведення вимірів та розрахунків проводили з використанням програми AAS-SPECTR.

Іншою методикою вивчення мікроелементного складу тканини було використання растрового електронного мікроскопу РЕМ-102Э з прискорювальною напругою 30кВ, оснащеного енерго-дисперсійним спектрометром. Зрізи тканини МЗ виготовляли завтовшки 5мкм, наносили на спектрально-чистий графітний відшліфований на целюлозній основі стержень, проводили зневоднення та дегідратацію матеріалу у ксилолі та спиртах. З метою виключення впливу парафінової проводки на хімічний склад тканини для порівняння було виконано 10 кріостатних зрізів. Зразки вкладалися на колодки та поміщалися в вакуумну камеру растрового електронного мікроскопу. Зображення отримували за допомогою програмного забезпечення «VCU». Хімічний склад складових компонентів пухлини досліджували енерго-дисперсійним спектрометром та виводили результати за допомогою спеціально розробленої комп'ютерної програми

«Magellanes». Цей метод дозволив визначити МЕ як в паренхіматозному, так і стромальному компонентах пухлини, з'ясувати хімічний склад мінералізаторів МЗ.

### **2.5. Виділення та дослідження ДНК.**

ДНК екстрагували з тканини з використанням лізуючого протезного буфера (рН 8,0), який складався з 30мМ тріс-гідроксиметил-амінометану, 10мМ етилендіамінтетраоцетової кислоти, 1% додецилсульфату натрію і  $5 \times 10^{-4}$  протеїнази К («Sigma-aldrich», США). ДНК очищали шляхом екстракції фенол-хлороформом з подальшим осадженням в абсолютному етанолі і зберіганням у холодильній камері при температурі  $-10^{\circ}\text{C}$ .

Дослідження фрагментації ДНК проводили в 1% агарозному гелі на основі електрофоретичного буферу (тріс-гідроксиметил-амінометан – 24,22г, етилендіамінтетраоцетова кислота – 1,862г, оцетова кислота – 8,96мл, дистильована вода – 73,3мл, рН 8,0 – після змішування компонентів розчин розводили у 50 разів дистильованою водою). Продукт електрофорезу візуалізували люмінесценцією в ультрафіолетовому спектрі (420нм), після поєднання ДНК з акридиновим оранжевим. В якості маркера використовували ДНК фага  $\lambda$  ( $\sim 49000\text{bp}$ ).

Рівень метилювання ДНК визначали на базі Інституту монокристалів Національної академії наук України. Отриманий ДНК продукт перетирали з КВг та укладали у таблетки з наступною ІЧ спектروفотометрією за Фур'є на спектрометрі SpectrumOne (PerkinElmer). Аналіз спектрів проводили у програмі Oridion Version 8.

### **2.6. Проведення морфометричних та математичні розрахунків.**

Вимірювання розмірів складових елементів мікропрепаратів проводили у середовищі морфометричної програми «Digitizer». Визначалися середні значення співвідношення паренхіми до строми, розміри мікрівідкладань солей кальцію, площу васкуляризації тканини, розміри тканини, зайняті

запальним інфільтратом. Отримання та зберігання знімків препаратів проводили за допомогою цифрової системи виведення зображення «SEO Scan ICX 285 AK-F IEE-1394» (Україна).

Обробка даних проводилася прикладними статистичними методами, які використовуються в медицині, за допомогою програми Microsoft Excel 2010 з додатком AtteStat 12.0.5.

Першочергово вибірки перевірялися на нормальність. Нормальними вважали ті показники, які відповідали одній з трьох умов:

1. якщо незалежні вибірки мають великий об'єм (не менше за 30 кожна) при оцінці показника за його наявності (1) або відсутності (0) [332];
2. якщо (згідно теорії Чебишева) на показник впливає декілька факторів [333];
3. якщо значення  $\chi^2$  (критерій Пірсона), яке ми спостерігаємо, менше значення  $\chi^2$  критичного (згідно таблиці критеріїв Пірсона).

Оцінку вірогідності розбіжностей порівнюваних показників проводили з використанням t-критерію Стьюдента за умови підтвердження випадковості розбіжностей ( $F_{\text{критичне}} > F_{\text{експериментальне}}$ ) згідно критерію Фішера. Якщо  $t_{\text{експериментальне}} \geq t_{\text{критичне}}$ , то різниця вважалась достовірною. Взаємозв'язок між досліджуваними показниками оцінювали згідно критерію кореляції Пірсона та Спірмена ( $r$ ). Результати вважали статистично достовірними при ступеню вірогідності більше 95% ( $p < 0,05$ ) за умови  $r_{\text{експериментальне}} \geq r_{\text{критичне}}$ .

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.

#### **3.1. Захворюваність на рак молочної залози в Сумській області за 2004-2014 рр. та їх клініко-морфологічна характеристика.**

Захворюваність на РМЗ у Сумській області, як в Україні та світі в цілому, продовжує щорічно зростати, що пов'язано з поширенням цієї зловісної недуги та, в якійсь мірі, з вдосконаленням діагностики захворювань МЗ [1-2]. Так в період з 2004 по 2014 роки число хворих, прооперованих в Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері з приводу РМЗ, збільшилося на 37% (2004 рік – 222, 2014 – 305). В структурі загальної патології у прооперованих РМЗ займає також лідируюче місце. Так, у 2004 році з 570 прооперованих РМЗ склав 39% (у 22% діагностовано фіброаденому, 38,5% складала різні форми фіброзно-кістозної хвороби та 1 випадку діагностовано фібросаркому), а у 2014 році епітеліальні неоплазії МЗ були виявлені у 46% випадків (всього прооперовано 662 жінки), у 25% та у 29% фіброаденоми та фіброзно-кістозні хвороби відповідно.

Щодо розподілу по районах, то згідно даних відділу статистики при Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері відносно великі показники захворюваності на РМЗ спостерігаються в Шосткінському, Ямпільському та С-Будському районах, при більш низьких показниках в Краснопільському, В-Писарівському та Тростянецькому районах (рис. 3.1). Так, розраховуючи на 100 тис. населення, кількість жінок, хворих на РМЗ, в північних районах майже в два рази переважає над онкохворими з відносно «екологічно-чистих» районів Сумської області.

Аналіз гістологічних форм РМЗ показує, що серед них на першому місці стоїть ІПРМЗ (90% випадків). Такі варіанти злоякісного процесу МЗ як медулярний рак, слизовий рак, рак Педжета, часточковий інфільтративний

рак та неінфільтративні часточково-протокові варіанти РМЗ складають близько 10%. Ключових відмінностей в розподілі РМЗ за гістологічними типами, порівнюючи з обласними показниками, в «екологічно-чистих» та «екологічно-забруднених» регіонах області за період 2004-2014 роки (578 випадків) не встановлено (табл. 3.1): 91% приходить на ІІРМЗ та 9% на всі інші форми РМЗ.

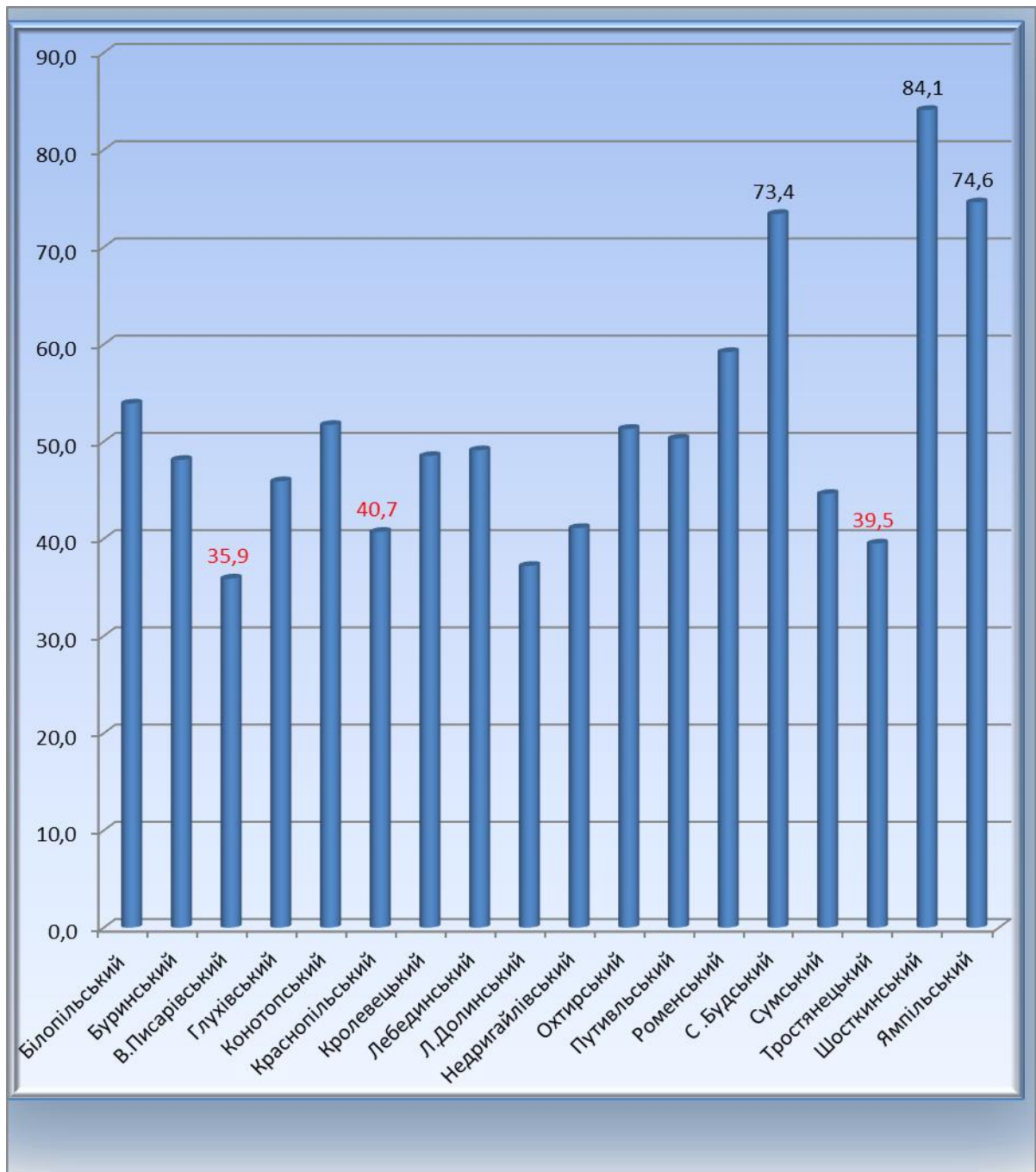


Рис. 3.1. Захворюваність на РМЗ в Сумській області за 2013 рік  
(на 100 тис. населення).

Таблиця 3.1

Гістологічні види РМЗ в районах Сумської області  
за період 2004-2014 років

	Види РМЗ				
	ІПРМЗ	Медулярний рак	Слизовий рак	Рак in situ	Часточковий рак
Шосткинський	157	5	3	3	5
Ямпільський	89	5	2	2	3
С-Будський	96	3	0	1	2
В-Писарівський	61	2	2	1	3
Тростянецький	70	1	0	2	2
Краснопільський	53	1	1	1	2

Більш детально були досліджені випадках ІПРМЗ, що діагностовано за період 2012-2015 років. Вік пацієток був в діапазоні від 42 до 76 років. Середній вік склав 59 років. Віковий склад груп наведено у табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Віковий склад обстежених жінок

Назва групи		Вікові групи					
		42-50	50-55	55-60	60-65	65-70	70-76
Перша група	Жінки з «екологічно-забруднених» районів	6	11	15	14	9	6
Друга група	Жінки з «екологічно-чистих» районів	4	6	10	7	5	1

Як видно з табл. 3.2 найбільшу вікову групу складають жінки від 55 до 65 років (47,5% та 51,5% відповідно).

У 25 жінок першої групи та у 12 другої було виявлено метастатичне ураження регіонарних лімфатичних вузлів, кількість яких коливалася від 1 до 10. Взаємозв'язок між наявністю метастазів, їх кількістю та групою

розподілу РМЗ не встановлено ( $p > 0,05$ ), в першій групі вони зустрічалися всього на 5% частіше.

При морфологічному дослідженні операційного матеріалу в усіх випадках визначалося вузлове ураження МЗ, в більшості випадків з необмеженими контурами, переважно щільної консистенції (іноді хрящової щільності), який різко відрізняється по кольору від навколишньої тканини МЗ. Пухлинний вузол міцно пов'язаний з навколишньою тканиною, ріжеться з прикладанням зусиль. Поверхня зрізу сірого кольору, іноді видно крововиливи, кальцифікати, які визначалися візуально або за характерним звуком під час проведення розрізу, та вогнища некрозу жовтого кольору (рис. 3.2).



Рис. 3.2. Вузол інфільтративного раку з вторинними змінами у вигляді крововиливу та некрозу.

Розміри зони ураження коливаються від 1,3см до 12,0см в діаметрі. Контури ракового вузла в більшості випадків нерівні та у вигляді тяжів, які проникають у тканину МЗ з формуванням зірчастої конфігурації. У 5 випадках пухлина мала рівні контури.

Патологічні вогнища розташовувались у 58% випадків у лівій МЗ, у 3 випадках виявлено білатеральне ураження. 45% уражень знаходилось у

верхнезовнішньому квадранті, 28% – у центральному, 22% – у верхневнутрішньому та у 5% – у нижнезовнішньому та нижневнутрішньому квадрантах МЗ. У 4 випадках рак поширювався на шкіру. Гематогенне поширення пухлини, згідно клінічних даних, виявлено у 3 випадках. Статистично достовірного взаємозв'язку між макроскопічними особливостями пухлинного вогнища та групою розподілу тканини не виявлено ( $p>0,05$ ).

У табл. 3.3 наведено розподіл досліджуваних пухлин згідно класифікації TNM.

Таблиця 3.3

## Розподіл випадків РМЗ згідно класифікації TNM

Стадія РМЗ за TNM	Перша група	Друга група
T <sub>1</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	11	8
T <sub>1</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	3	1
T <sub>2</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	23	12
T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	17	7
T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>	2	1
T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	2	2
T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	1	0
T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>	1	1
T <sub>4</sub> N <sub>1</sub> M <sub>1</sub>	0	1
T <sub>4</sub> N <sub>2</sub> M <sub>1</sub>	1	0

Як ми бачимо з табл. 3.3 більша частина випадків припадає на пухлини розміром від 1,3см до 5см (61% в першій та 64% в другій групі). Аналізуючи наявність метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів, можна зробити висновок, що цей процес не залежить від розміру пухлини РМЗ ( $p>0,05$ ), що вказує на незалежний процес метастатичного поширення від місцевого зростання новоутворення.

Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що захворюваність на РМЗ в Сумській області неухильно росте та за останні 10 років її показники збільшилися на 37%. Серед всіх видів неоплазій переважає ІПРМЗ (91%). Виявлено переважання РМЗ саме у тих регіонах, в яких спостерігається підвищена кількість СВМ у навколишньому середовищі. Залежності між формою, розміром, наявністю метастазів, поширенням на навколишні тканини та групою розподілу тканин не виявлено.

### **3.2. Гістологічне дослідження інфільтративного протокового раку молочної залози.**

Мікроскопічне дослідження проводилося на пухлинах МЗ, в яких після забарвлення гематоксиліном та еозином було встановлено діагноз «Інфільтративний протоковий рак молочної залози». ІПРМЗ характеризується формуванням гнізд, кластерів та трабекул, хоча деякі пухлини відрізняються солідним ростом з незначною кількістю строми. В частині пухлин виявляються чіткі тубулярні структури з просвітом у центрі. Клітини доволі варіабельні за будовою. Цитоплазма частіше буває широкою та еозинофільною. Ядра округлі, мономорфні або з вираженим поліморфізмом і добре помітними ядерцями. Мітотична активність сильно варіює – від повної відсутності до 10-20 та більше в одному полі зору. Обов'язковою умовою є вихід пухлинного росту за межі базальної мембрани протоків. Поблизу фокусів інфільтративної карциноми часто зустрічаються вогнища протокової карциноми *in situ*. Виявляються ділянки некрозу та гіалінозу. В міру зниження диференціювання раку об'ємна частина строми зменшується, пухлинні клітини формують солідні поля. У деяких випадках переважає фіброзна строма, а пухлинні клітини представлені окремими клітинами чи ланцюгами клітин. В інших випадках можуть переважати відносно відокремлені залозисті комплекси. Тільки коли всі ці ознаки пухлинного поширення займають більше 50% пухлинних полів зору, тканина підлягала подальшому дослідженню, бо була віднесена до ІПРМЗ. При

наявності менше 50% – виставлявся діагноз «Рак змішаного типу» чи якийсь специфічний варіант інвазивного РМЗ, і тканина автоматично виключалась із групи дослідження.

В залежності від наявності тубулярних структур, рівня проліферативної активності клітин (кількості мітозів) та рівня клітинного атипізму пухлини були розподілені на три групи:

1. G1 – високодиференційовані пухлини (низького ступеня злоякісності);
2. G2 – помірнодиференційовані пухлини (помірного ступеня злоякісності);
3. G3 – низькодиференційовані пухлини (високого ступеня злоякісності).

Для G1 ступеню диференціювання РМЗ (рис. 3.3) характерним є утворення тубулярних структур, які займають більше 75% площі препарату. Цей вид пухлини найбільш наближений до проліферативних варіантів фіброзно-кістозної хвороби. Більшість клітин мають правильну форму та дрібні ядра, інколи простежуються різні варіанти ядерного і клітинного поліморфізму.

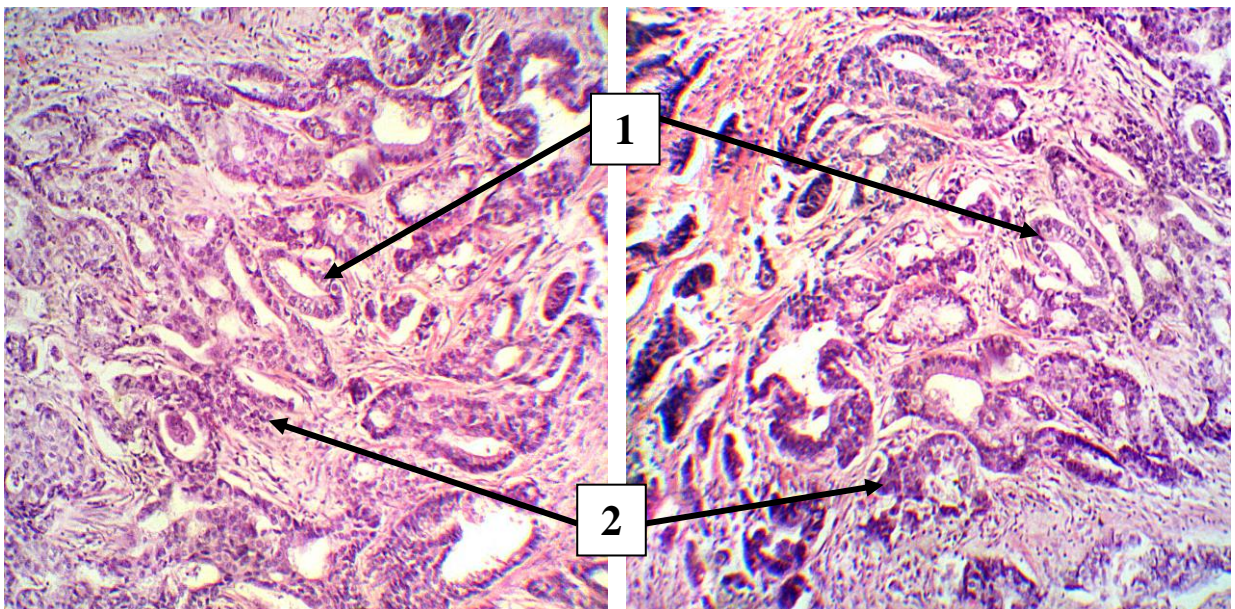


Рис. 3.3. ІПРМЗ низького ступеню злоякісності.

1 – тубулярні структури, 2 – ділянки інвазії.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 100$ .

Мітотична активність у високодиференційованої пухлини низька – від повної її відсутності до 10-15 мітозів у 10 полях зору при оптичному збільшенні мікроскопу  $\times 400$ . Структури раку можуть повторювати будову протоків, але в стромі присутні окремі комплекси пухлинних клітин, що підтверджує інвазивний тип росту пухлини. Згідно класифікації С.W. Elston та I.O. Ellis пухлина відповідає 3-5 сумі балів.

ІПРМЗ помірного ступеню злоякісності (рис. 3.4) характеризується поступовим зменшенням відсотку поширеності тубулярних структур серед пухлинної тканини, які подекуди займають не більше 10% (G2). Неопластичні клітини мають різний ступінь клітинного та ядерного поліморфізму. В них присутній значний проліферативний потенціал за рахунок значної кількості мітозів.

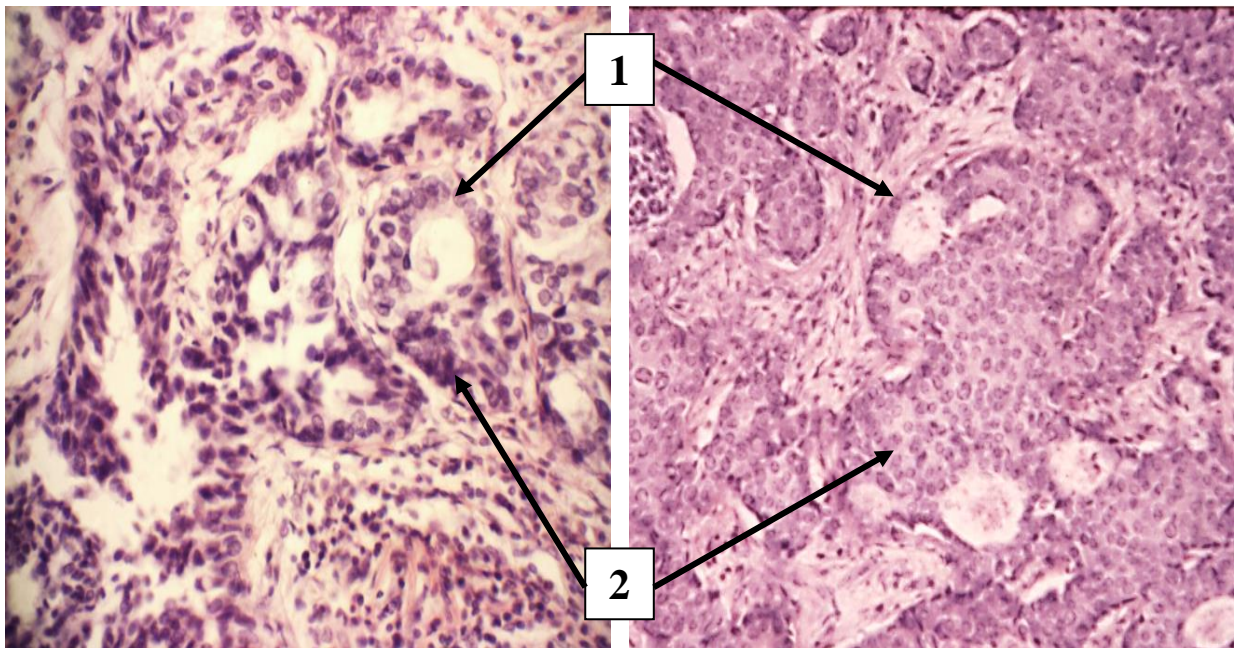


Рис. 3.4. ІПРМЗ помірного ступеню злоякісності.

1 – тубулярні структури, 2 – солідні утворення.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 150$ .

Гістологічна картина пухлини знаходиться посередині між високо та низькодиференційованими варіантами РМЗ, тому на препараті можна знайти поля як одного, так і іншого варіантів пухлини МЗ.

У помірнодиференційованій неоплазії іноді присутні ділянки солідно-альвеолярної будови і, навпаки, відмічається скірозний тип росту, коли на фоні гіалінозу строми клітини формують ланцюжки, дрібні залозисті стуртури, невеликі солідні скупчення. В препараті помітні ділянки некрозу та дистрофічні зміни. Згідно класифікації С.W. Elston та I.O. Ellis даний вид неоплазії відповідає 6-7 сумі балів.

G3 ступінь диференціювання ІПРМЗ (рис. 3.5) характеризується майже повною відсутністю тубулярно-залозистих структур, вираженим клітинним та ядерним атипізмом, значною кількістю патологічних мітозів, багатоядерністю, гіперхроматозом ядер.

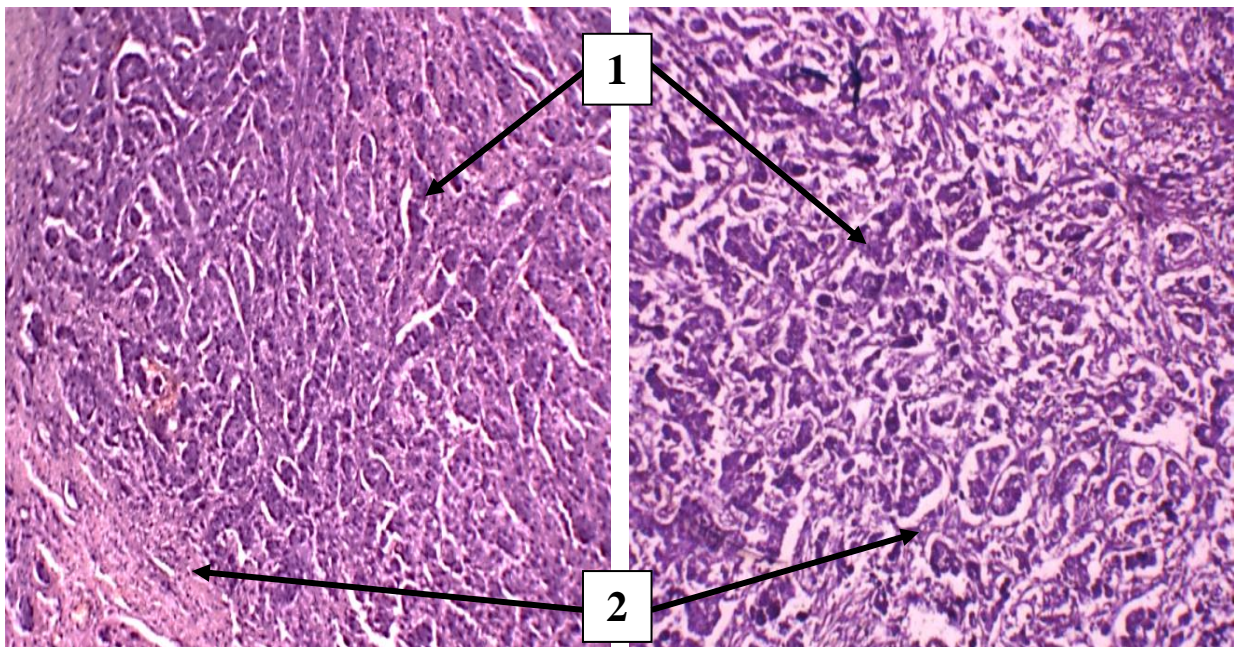


Рис. 3.5. ІПРМЗ високого ступеню злоякісності.

1 – паренхіма пухлини, 2 – строма пухлини.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 100$ .

У G3-пухлині в 10 полях зору при оптичному збільшенні мікроскопу можна знайти більше 20 мітозів. Тканина пухлини може складатися як з переважання паренхіматозного компоненту з майже повним витісненням строми, так і мати яскраво виражений скірозний варіант, при якому на фоні гіалінізованої сполучної тканини знаходяться окремо розсіяні або у вигляді ланцюжків неопластичні клітини.

Пухлинні клітини можуть бути у вигляді дрібних (лімфоцитоподібних) клітин з майже відсутньою цитоплазмою та дрібними гіперхромними ядрами. Іноді їх поліморфізм виражений у такому ступені, що їх навіть важко віднести до епітеліальних (підозра на недиференційовану пухлину) злоякісних пухлин. У більшості випадків тканина пухлини складається з великих клітин, які втратили можливість до характерного розподілу епітелію у вигляді шарів, але зберігають тенденцію до адгезії. У клітинах нерідко добре видна цитоплазма та великі поліморфні ядра з кількома ядерцями. Патологічні мітози виражені в різному ступені з формуванням виродливих багатоядерних клітин (рис. 3.6). У пухлинній тканині частіше за всі інші форми ІПРМЗ спостерігалися вторинні зміни у вигляді петрифікації, некрозів та запалення.

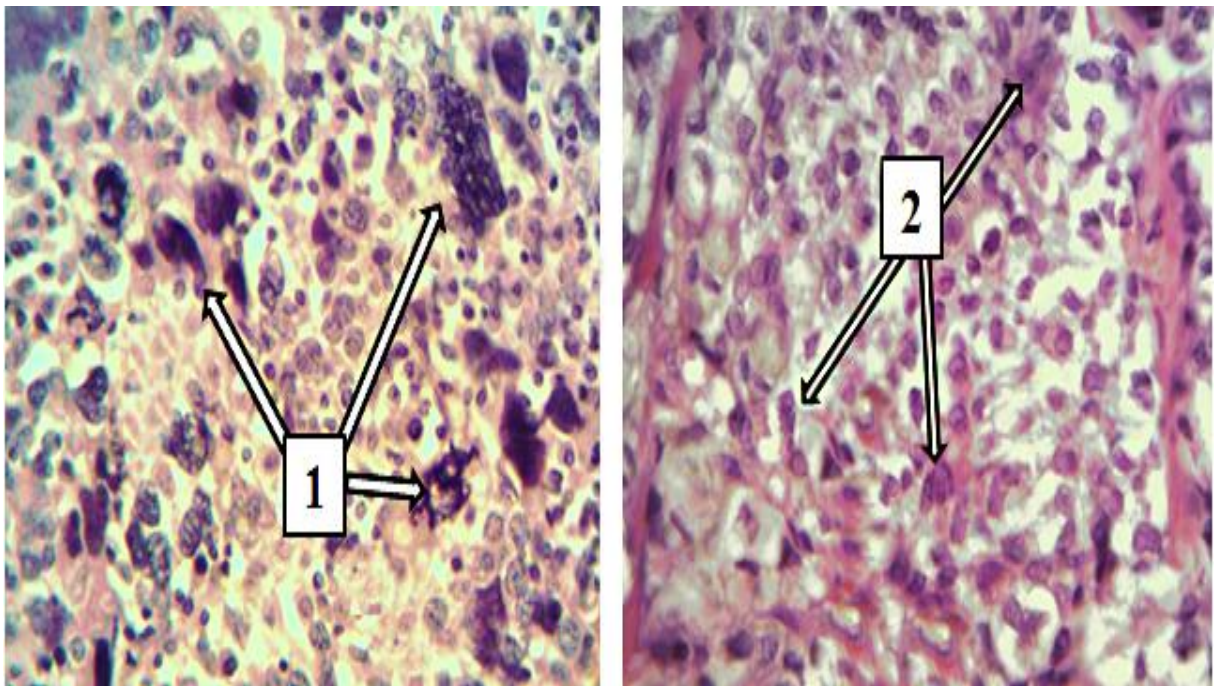


Рис. 3.6. ІПРМЗ високого ступеню злоякісності.

1 – виродливі багатоядерні клітини, 2 – патологічні мітози.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 400$ .

Згідно класифікації С.W. Elston та I.O. Ellis даний вид неоплазії відповідає 8-9 сумі балів.

В окремих випадках було важко віддиференціювати ІПРМЗ високого ступеню злоякісності від інфільтративного дольового РМЗ того ж ступеню анаплазії. В цьому випадку нам допомагало ІГХ дослідження з визначенням експресії рецепторів до Е-кадгерину. При позитивному забарвленні ракових клітин (наявність мембранної реакції) пухлину відносили до ІПРМЗ (рис. 3.7).

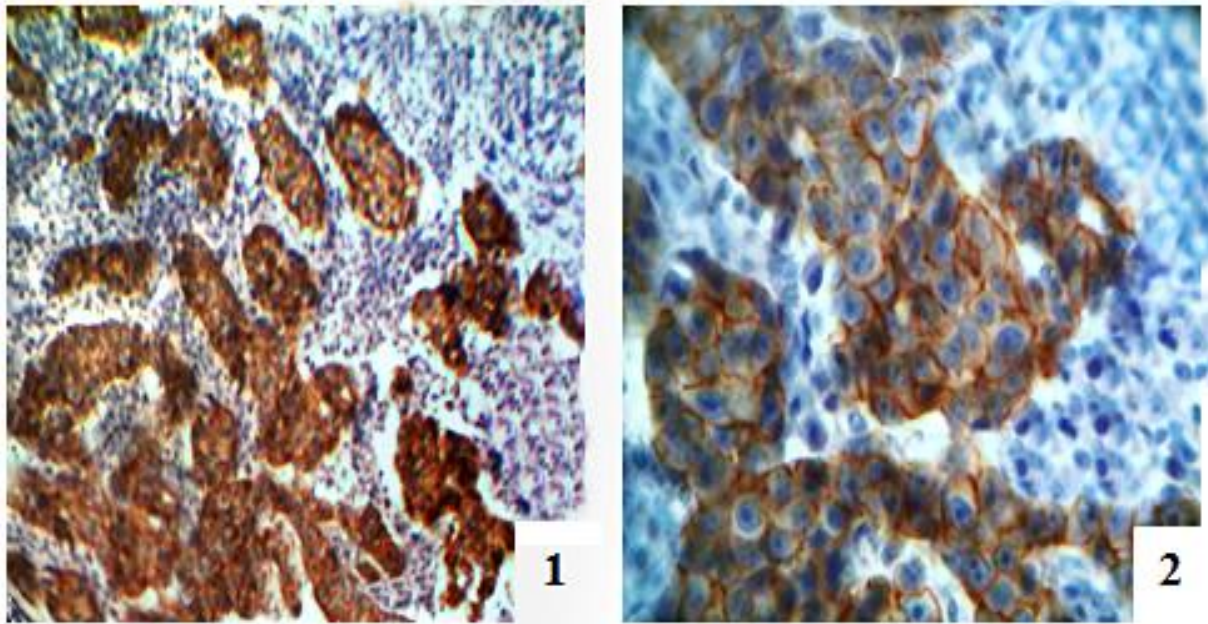


Рис. 3.7. ІПРМЗ низького ступеня диференціювання.

ІГХ реакція по виявленню рецепторів Е-кадгерину: позитивна інтенсивна мембранна реакція.

1 – збільшення  $\times 100$ , 2 – збільшення  $\times 400$ .

У табл. 3.4 наведено розподіл ІПРМЗ за ступенем диференціювання в залежності від досліджуваної групи. Як видно, в першій групі (жінок з «екологічно-забруднених» районів) випадки з низьким ступенем диференціювання (G2 та G3) зустрічали частіше ніж в другій (жінок з «екологічно-чистих» районів), що підтверджено статистичними розрахунками ( $p < 0,05$ ).

Це вказує на негативний вплив оточуючого середовища та екзогенного надходження СВМ на перебіг ІПРМЗ, в результаті чого неопластична тканина набуває нових гістологічних характеристик.

Таблиця 3.4

## Розподіл тканини ІПРМЗ за ступенем диференціювання

Ступінь диференціювання ІПРМЗ	Перша група	Друга група
G1	8	11
G2	17	13
G3	36	9

Аналіз гістологічної картини в порівнянні з макроскопічними особливостями пухлини виявив наступні особливості: негативний кореляційний зв'язок між наявністю метастазів та ступенем диференціювання пухлини ( $p < 0,05$ ), підвищену проліферативну активність на периферії, у порівнянні з центральною зоною пухлини, яка супроводжувалась наявністю променеподібних розростань раку в навколишню тканину, наявність ураження шкіри та гематогенних метастазів у випадку тільки низькодиференційованого ІПРМЗ. Це вказує на прогресування пухлинного росту зі зниженням диференціювання РМЗ.

Серед варіантів вторинних змін у пухлинному мікрооточенні були присутні вогнища некрозу, петрифікації та змішано-клітинна запальна інфільтрація.

При проведенні гістологічного дослідження препаратів, забарвлених гематоксиліном та еозином, встановлено, що біомінералізати розташовуються в усіх компонентах пухлинної тканини ІПРМЗ – стромі, паренхімі та внутрішньопротоково. Виявлені різні варіанти їх розташування в пухлинній тканині (рис. 3.8):

- вогнищева петрифікація, коли на всьому полі мікропрепарату знаходиться одне вогнище відкладання солей кальцію;

- дифузно-розкидані по тканині злоякісної пухлини поодинокі мінералізати;

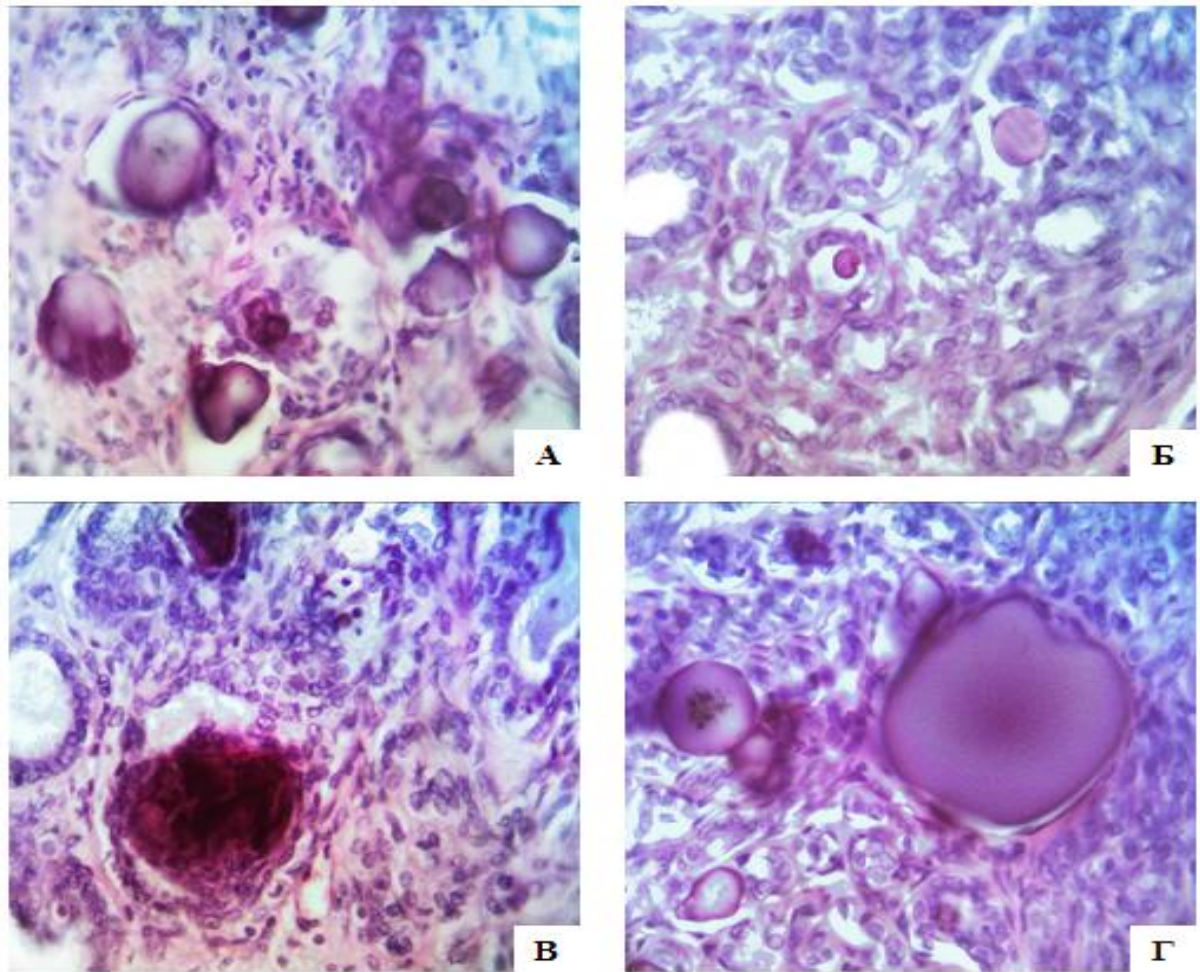


Рис. 3.8. Види розташування мінералізаторів у тканині ППМЗ.

А – вогнищева петрифікація, Б – дифузно-розкидані мінералізати, В – внутрішньопротокові відкладання солей кальцію, Г – «брила» петрифікату з дрібними «дочірніми» вогнищами кальцифікації.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 300$ .

- одна відносно велика «брила» петрифікату з навколо розташованими дрібними «дочірніми» вогнищами кальцифікації;
- петрифікати у вигляді півмісяця або замкнутого кола, які повторюють контури протоків МЗ;
- округлі, чітко контуровані мінералізати, які повністю або частково виповнюють просвіт залози або протоку МЗ;
- комбіновані варіанти розташування відкладання солей кальцію.

При виявленні кальцифікатів за допомогою забарвлення парафінових зрізів алізариновим червоним S, поряд з гематоксиліном та еозином, встановлено, що біомінералізати мали різну форму: округлу, X-подібну, сферичну з обідком мінералізації та у вигляді поздовжніх гранул (рис. 3.9).

У ряді випадків на одному і тому ж препараті були присутні як різні види розташування відкладань солей кальцію, так і різні форми біомінераліватів.

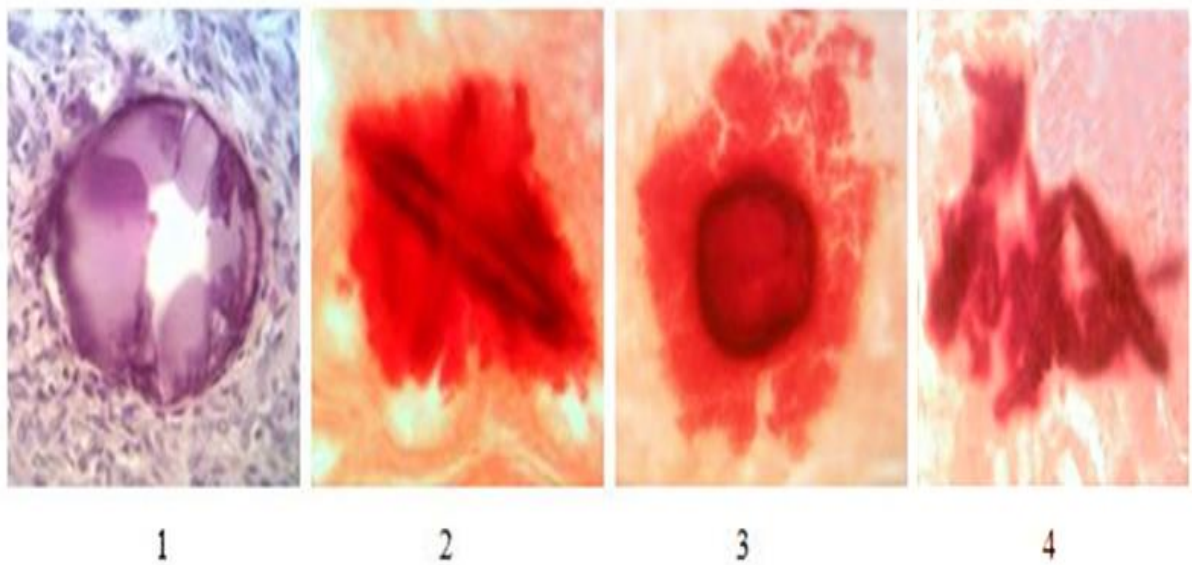


Рис. 3.9. Види мінераліватів у тканині РМЗ.

1 – округла форма (забарвлення гематоксиліном та еозином), 2 – X-подібна форма, 3 – сферична форма з обідком мінералізації, 4 – у вигляді поздовжніх гранул (2,3,4 – забарвлення алізариновим червоним S). Збільшення  $\times 400$ .

Аналізуючи розміри біомінераліватів у середовищі морфометричної програми «Digitizer», встановлено, що вони представлені від ледь помітних вогнищ ( $0,001 \times 0,001$  см) до утворень  $0,4 \times 0,4$  см (рис. 3.10).

Будь-якого взаємозв'язку між розміром петрифікату та видом патологічної біомінералізації нами не виявлено.

При порівнянні частоти виявлення петрифікації в першій та другій групах дослідження встановлено, що тканина ІПРМЗ жінок, які мешкали в

«екологічно-забруднених» районах Сумської області містили вогнища звапнення на 19% частіше, 45% проти 26% випадків, ніж у другій групі.

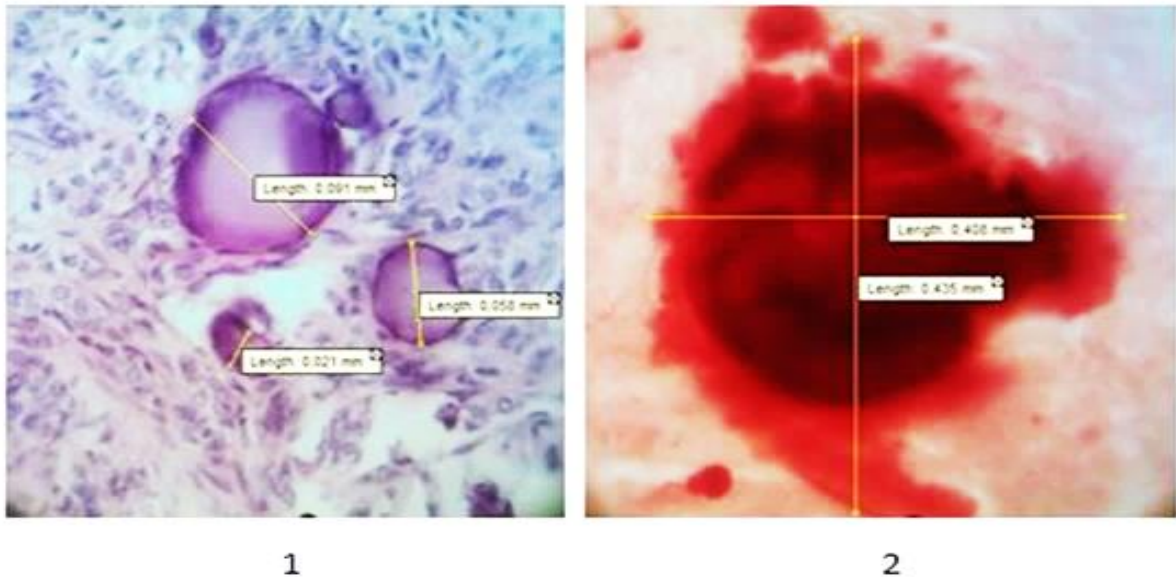


Рис. 3.10. Вимірювання розмірів мікровідкладань програмою «Digimizer».

1 – забарвлення гематоксилином та еозином, 2 – забарвлення алізариновим червоним S. Збільшення  $\times 400$ .

Виявлена кореляційна залежність між зниженням рівня диференціювання раку та інтенсивністю мінералізації МЗ ( $p < 0,05$ ). Залежності між формою, розміром, видом розташування біомінералізацій та типом диференціювання ІПРМЗ не виявлено ( $p > 0,05$ ).

При дослідженні препаратів, забарвлених алізариновим червоним S привертає увагу обідок мінералізації навколо кристалів кальцію. Він представлений зоною різної товщини з поступовим зменшенням інтенсивності забарвлення алізарином від центру до периферії, відповідно зниженням насиченості кальцієм зони петрифікації. Це вказує на прогресуючий перебіг утворення мінералізацій від периферії до центру, з поступовим ущільненням структури конкрементів.

Іншою особливістю мінералогенезу в МЗ є наявність пухлинних клітин ІПРМЗ з внутрішньоклітинними гранулами, які також алізарин-позитивні. Це наводить на думку, що процес петрифікації відбувається не тільки

позаклітинно, а ініціювання його з подальшим прогресуванням відбувається за участю внутрішньоклітинних механізмів.

Дослідження, спрямоване на вивчення особливостей лейкоцитарної інфільтрації, виявило, що в навколишньому пухлинному мікрооточенні наявність клітин імунної системи не є випадковою знахідкою. Вони представлені різними варіантами клітин. Значна частка клітин має округлу форму з округлим або бобовидним ядром і невеликою кількістю цитоплазми, розміром біля 6мкм, які ідентифіковані як лімфоцити. Віднести їх до Т чи В групи лімфоцитів за гістологічними особливостями не можливо. Серед них зустрічаються гістіоцити, які характеризують наявністю різної (округлої, витягнутої чи неправильної) форми, щільного, гетерохромного ядра, базофільної неоднорідної плямистої (з-за присутності лізосом) цитоплазми, розміром біля 13мкм. Виявлено також розсіяні різні форми сегментованих гранулоцитів з внутрішньоклітинною зернистістю. Встановити відсоткове співвідношення між лейкоцитами не представлялося можливим за рахунок однотипності лімфоцитів та інших форм лейкоцитів.

При вивченні топографічних особливостей розташування клітин імунного мікрооточення встановлено, що вони можуть знаходитись навколо тканини раку в різних варіаціях (рис. 3.11):

- інтерстиційно – у вигляді поодиноких розкиданих клітин на фоні як щільної так і пухкої сполучної тканини, без значного порушення навколопухлинного середовища;
- трабекулярно – клітини розташовуються у вигляді ліній, тяжів та трабекул, ніби розшаровують волокна сполучного компонента стромы;
- вогнищево (нодулярно) – у вигляді утворень округлої форми, інколи з формуванням псевдофолікулів. Вони мають різні розміри. Інколи в них можна помітити навіть центри розмноження, що вказує на стимулюючий місцевий антигенний вплив пухлини на реакцію навколишньої тканини;
- дифузно – займає майже всю міжклітинну пухлинну тканину, інколи навіть площа, зайнята імуноцитами, переважає над площею ракової

тканини, створюючи враження метастазу аденокарциноми у лімфатичному вузлі;

- змішано – поєднання різних форм запальної інфільтрації.

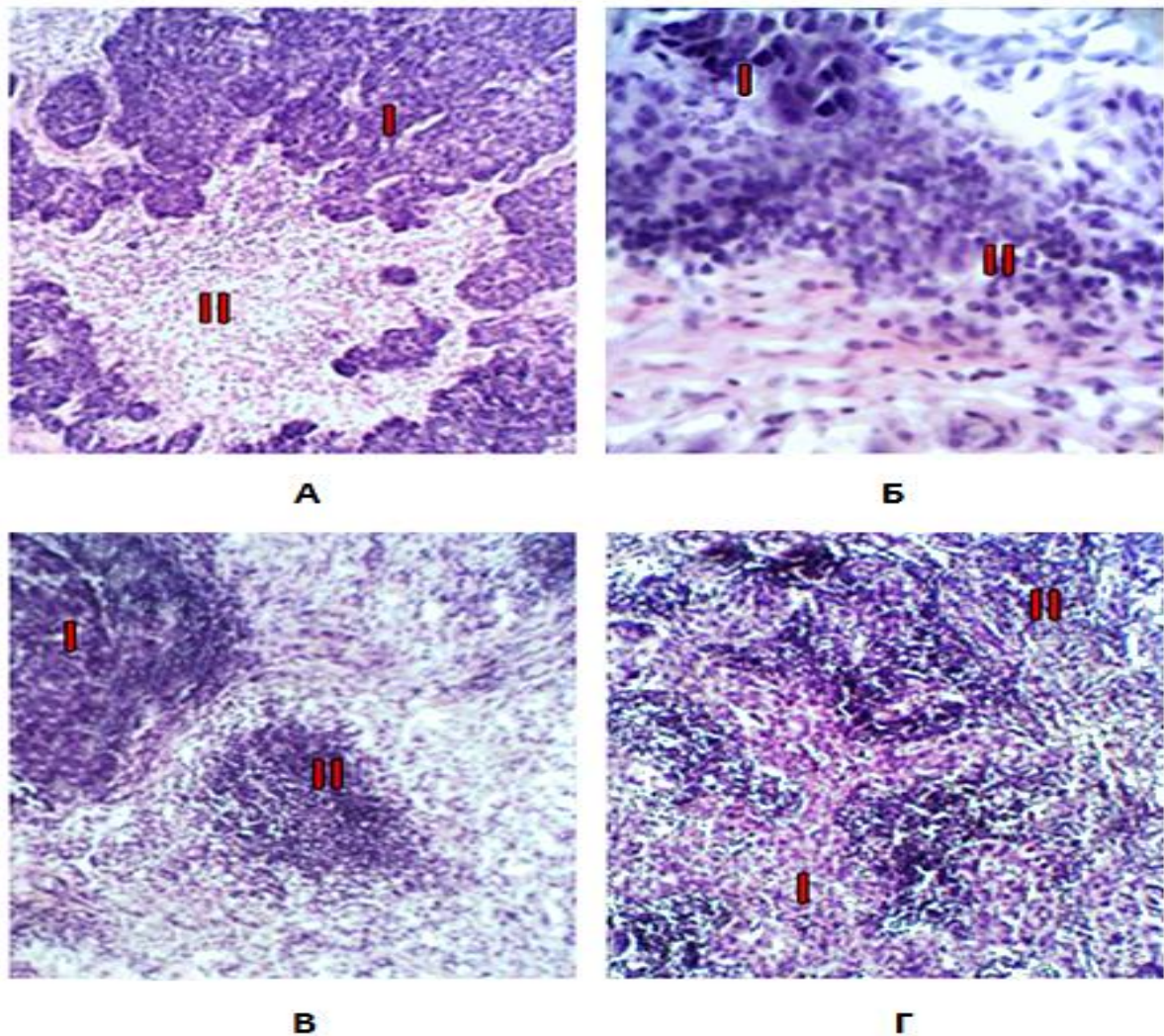


Рис. 3.11. Види імунного мікрооточення.

А – інтерстиційний, Б – трабекулярний, В – вогнищевий, Г – дифузний.

Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення  $\times 100$ .

Слід зазначити, що у стромі пухлинної тканини, яку вважали за таку, що не має імунної реакції в навколишній тканині, також були присутні клітини імунної системи, тому як вони є складовою частиною фіброзної тканини будь-якого органа, в т.ч. і МЗ, але вони знаходяться поодиноці і дуже розріджено.

В окремих випадках імунна відповідь виражалась у вигляді хронічного продуктивного запалення з формуванням гранульом, які, поряд з вище зазначеними типами клітин, містили епітеліоїдні та гігантські клітини типу «сторонніх тіл» (рис. 3.12), що вказує на персистенцію імунної відповіді на провокуючий етіологічний фактор.

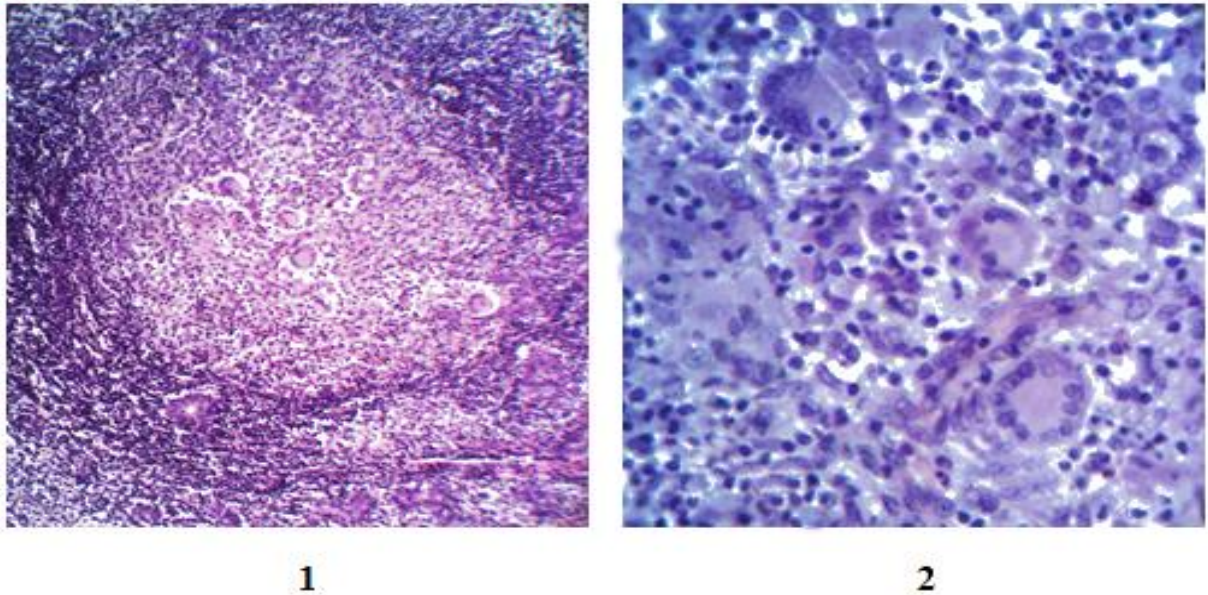


Рис. 3.12. Гранульома з гігантськими клітинами в тканині МЗ.

Забарвлення гематоксилином та еозином. Збільшення 1 –  $\times 100$ , 2 –  $\times 400$ .

При гістологічному дослідженні встановлено, що лейкоцити у стромальному компоненті у різних випадках займали різний відсоток площі пухлинного мікрооточення: від групованих утворень, не більше 10% стромы, до повного заміщення пухлинного мікрооточення імунocyтaми.

Аналіз рівня запальної інфільтрації при різних гістологічних типах РМЗ виявив зростання імунної відповіді зі зниженням диференціювання раку. Було відзначено тенденцію до збільшення інфільтрації в разі зростання поліморфізму ракових клітин. Це свідчить про більш виражену реакцію макроорганізму у випадку прогресування анаплазії клітини. Чіткий взаємозв'язок між ступенем злоякісності ІПРМЗ і типом запального інфільтрату не виявлено ( $p > 0,05$ ). Відмічалось поєднання наявності мінералізації в тканині МЗ та запальної інфільтрації, що вказує на реакцію з

боку організму на чужорідний компонент, в якості якого виступають петрифікати та пухлинні клітини.

При вивченні рівня васкуляризації пухлинної тканини встановлено різний ступінь проростання раку судинами. Вони представлені як тонкостінними капілярами, так і більшими судинами, у вигляді венул та артеріол (рис. 3.13).

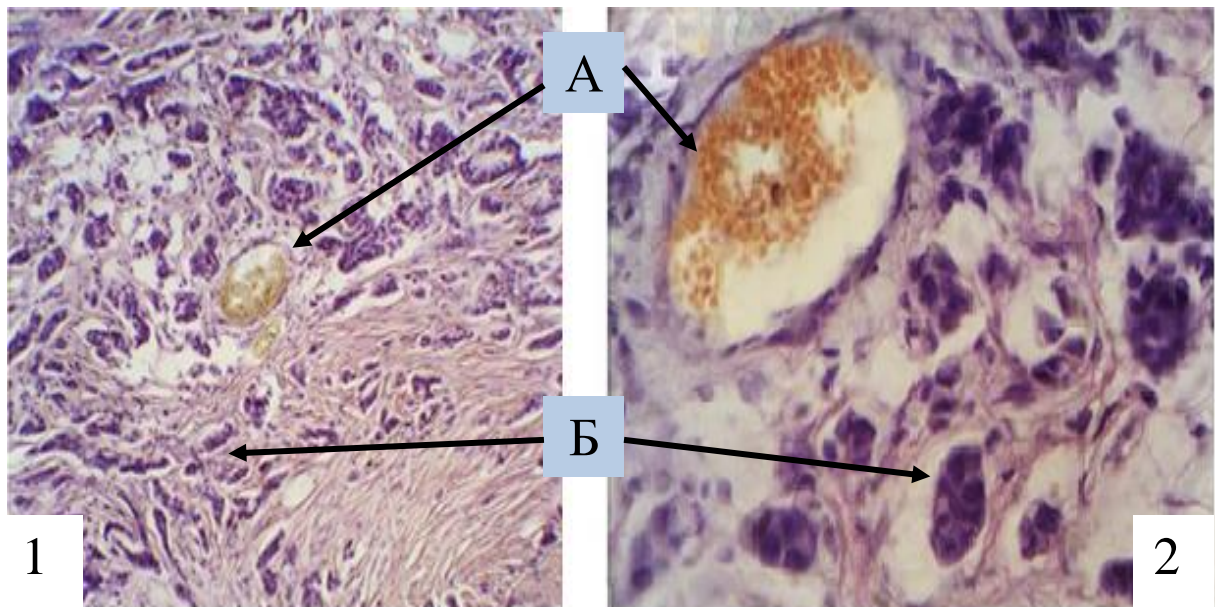


Рис. 3.13. ІІРМЗ помірного ступеня злжкності. А – судини, Б – тканина раку. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення 1 –  $\times 100$ , 2 –  $\times 400$ .

Процес васкуляризації виступає прогностично несприятливим маркером пухлинної прогресії, надаючи можливості раку до додаткового кровопостачання (надходження як поживних речовин, так і різних МЕ) та підвищуючи потенціал неоплазії до гематогенного розповсюдження.

Встановлено позитивний кореляційний зв'язок між рівнем васкуляризації тканини та видом диференціювання пухлини ( $r=0,46$ ).

Аналізуючи результати гістологічного та гістохімічного дослідження, можна зробити висновок, що ІІРМЗ супроводжується варіабельною морфологічною картиною, яка характеризується якісними та кількісними змінами, як паренхіматозного, так і стромального компонентів пухлини. Виявлено, що у жінок, які мешкають в «екологічно-забруднених» районах,

значно частіше спостерігається ІПРМЗ з низьким ступенем диференціювання пухлини, який поєднується зі зростанням рівня патологічної мінералізації і васкуляризації неоплазії та активацією імунної відповіді з боку макроорганізму. Наявність взаємозв'язків між різними морфологічними характеристиками ракової тканини вказує на синхронність змін в пухлині при варіабельності одного з показників неопластичної тканини.

Наявність обідка мінералізації навколо конкрементів та активна відповідь з боку імунної системи є індикатором прогресування ІПРМЗ, за рахунок якого, як пухлина може впливати на якісні характеристики навколишнього мікрооточення, так і вони на перебіг злоякісного процесу.

### **3.3. Дослідження елементного складу тканини інфільтративного протокового раку молочної залози.**

При визначенні мікроелементного складу тканини ІПРМЗ жінок із «екологічно-забруднених» районів шляхом атомно-абсорбційної спектрофотометрії встановлено, що вміст заліза складає від 60,24 до 69,63мкг/г (в середньому  $65,23 \pm 2,42$ мкг/г), міді – від 2,83 до 9,11мкг/г (в середньому  $5,98 \pm 1,62$ мкг/г), хрому – від 1,45 до 3,66мкг/г (в середньому  $2,56 \pm 0,62$ мкг/г), цинку – від 2,84 до 6,4мкг/г (в середньому  $4,44 \pm 0,99$ мкг/г), свинцю – від повної відсутності до 0,6мкг/г (в середньому  $0,11 \pm 0,089$ мкг/г) та нікелю – від 0,08 до 0,52мкг/г (в середньому  $0,3 \pm 0,06$ мкг/г). У другій групі порівняння жінок з «екологічно-чистих» районів Сумської області спостерігалися значно нижчі показники вмісту зазначених МЕ у пухлинній тканині. Так кількість Fe складає від 38,46 до 65,39мкг/г (в середньому  $49,56 \pm 5,81$ мкг/г), Cu – від 2,8 до 6,69мкг/г (в середньому  $5,06 \pm 1,01$ мкг/г), Zn – від 1,89мкг/г до 5,38мкг/г (в середньому  $3,88 \pm 0,89$ мкг/г), Cr – від повної його відсутності до 6,1мкг/г (в середньому  $2,13 \pm 1,29$ мкг/г), Ni – від 0,11 до 0,42мкг/г (в середньому  $0,28 \pm 0,067$ мкг/г) та Pb – від повної його відсутності до 0,19мкг/г (в середньому  $0,098 \pm 0,06$ мкг/г) (рис. 3.14).

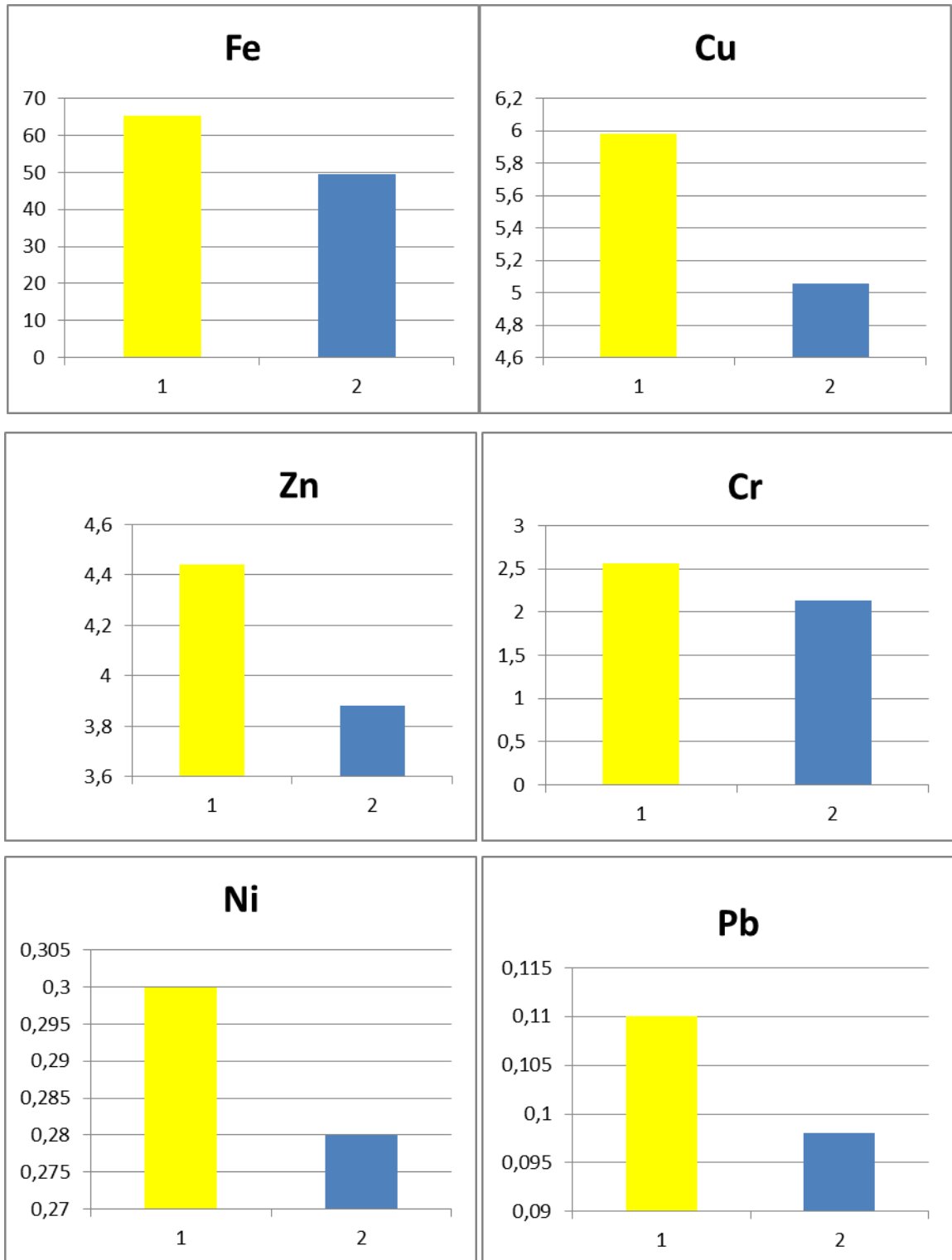


Рис. 3.14. Вміст ВМ у тканині ІПРМЗ (мкг/г).

Встановлено статистично достовірну різницю між накопиченням ВМ у двох групах тканин ( $p < 0,05$ ). Загальна кількість ВМ в першій групі складає від 71,36 до 84,86 мкг/г (в середньому  $78,63 \pm 3,47$  мкг/г), в другій групі – від 51,21 до 73,2 мкг/г (в середньому  $61,02 \pm 5,77$  мкг/г). Як бачимо вміст

вищезазначених елементів у групі порівняння на 22,4% менше за їх кількість у дослідницькій вибірці тканин.

Порівнюючи середні показники вмісту ВМ в пухлинній тканині між двома групами, виявлено, що кількість Fe у групі порівняння менше на 24% ( $p=0,001$ ), Cu – на 15,4% ( $p=0,002$ ), Cr – на 16,8% ( $p=0,016$ ), Zn – на 13,8% ( $p=0,005$ ), Pb – на 11,1% ( $p=0,026$ ) та Ni – на 9,3% ( $p=0,011$ ). Це підтверджує той факт, що з надходженням СВМ до організму жінок у підвищеній кількості з їжею та водою відбувається відкладання їх у тканинах макроорганізму, в тому числі і пухлинній тканині МЗ.

У МЗ без патологічних вогнищ та у віддалених метастазах кількість досліджуваних елементів була нижчою, у порівнянні з первинним вогнищем пухлини.

Встановлено взаємозв'язок ( $r=0,62$ ,  $p<0,05$ ) між накопиченням ВМ у вогнищах неоплазії і ступенем злоякісності РМЗ. Факт зростання концентрації МЕ в тканині ІПРМЗ з прогресуванням канцерогенезу можна пояснити порушенням механізмів регуляції засвоєння та утилізації ВМ пухлинними клітинами. Зростання рівня анаплазії ракових клітин призводить до блокування синтезу ферментів, які беруть участь в підтриманні внутрішньоклітинного гомеостазу епітеліоцитів. З іншого боку, підвищена кількість МЕ стимулює цей дисбаланс, підтримуючи зловісний вплив ВМ на перебіг злоякісного процесу.

Визначення елементного складу пухлинної тканини атомно-абсорбційною спектроскопією показує загальну кількість МЕ на грам досліджуваної тканини, але вона не дозволяє дослідити вміст цих елементів в різних структурних компонентах пухлини. З метою з'ясування просторових особливостей локалізації накопичення досліджуваних МЕ у раковій тканині проведено дослідження хімічного складу ІПРМЗ, який визначався енерго-дисперсійним методом на растровому електронному мікроскопі.

Процес визначення хімічного складу тканини МЗ відбувався у двох функціональних режимах: локальне сканування поверхні препарату при

різному рівні збільшення зображення та вогнищеве сканування, з урахуванням мікроелементного складу у паренхіматозному на стромальному компонентах пухлини (рис. 3.15).

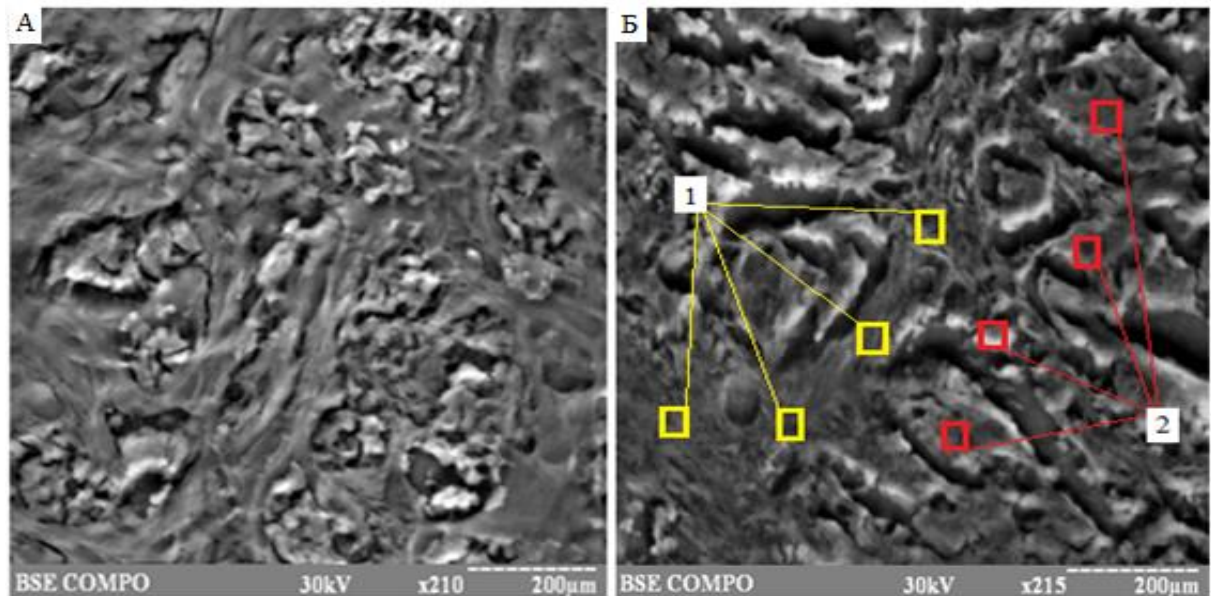


Рис. 3.15. Сканограми тканини ІПРМЗ. А – локальне сканування поверхні препарату (збільшення  $\times 210$ ), Б – вогнищеве сканування (збільшення  $\times 215$ ):  
1-стромальний компонент пухлини, 2 – паренхіматозний компонент.

Результати енерго-дисперсійної спектрометрії показують, що поряд з такими макроелементами, як кальцій, натрій, калій, фосфор, сірка та інші, які є обов'язковими складовими будь-якої тканини, в пухлинній тканині МЗ знаходились також такі ВМ як залізо, цинк, мідь, хром, нікель та сліди свинцю (рис. 3.16), що підтверджує виявлення їх методом атомно-абсорбційної спектрофотометрії.

При дослідженні хімічного складу складових компонентів препаратів ІПРМЗ, розташованих на спектрально-чистому графіті, встановлено, що більше накопичує ВМ паренхіматозний компонент пухлинної тканини ( $p < 0,05$ ). Пояснюється це тим, що саме клітини раку за рахунок порушення ендо-екзоцитозу хімічних речовин накопичують в середині МЕ, відповідно при зростанні їх кількості в судинах кровообігу (за рахунок підвищеного надходження СВМ до організму) може і зростати їх кількість всередині

клітин. Підтвердженням цього є дані, отримані при порівнянні хімічного складу двох груп дослідження. Отримані результати показують, що вміст ВМ в першій групі на 15-25% більший за кількість їх у жінок з «екологічно-чистих» районів області.

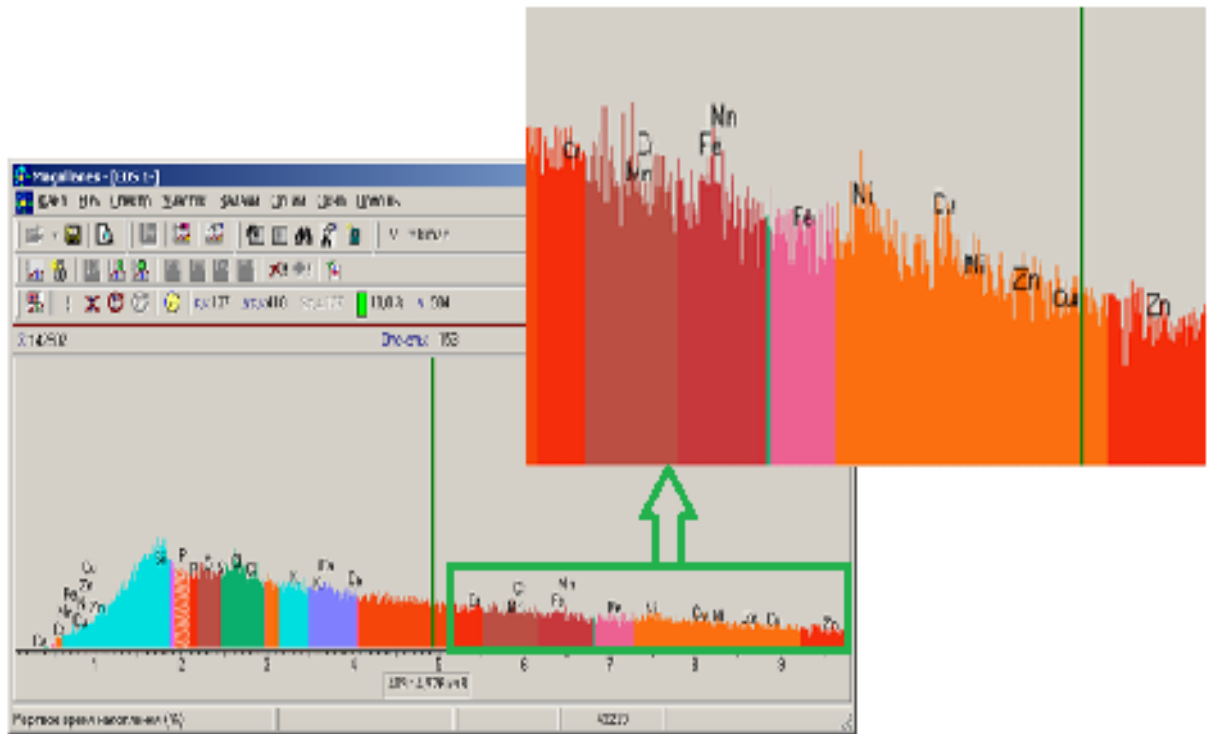


Рис. 3.16. Спектр хімічних елементів, виявлений під час енерго-дисперсійної спектрометрії.

При порівнянні даних двох досліджень по виявленню хімічного складу тканини ПРМЗ отримані ідентичні результати – при підвищенні концентрації ВМ вграмі пухлини, що виявляли атомно-абсорбційною спектрофотометрією, зростає їх відсоток вмісту, отриманим за допомогою енерго-дисперсійного методу дослідження ( $p < 0,05$ ).

Проведена растрова електронна мікроскопія пухлинної тканини з мінералізатами виявила в них окремі та згруповані у вигляді брил відкладання солей кальцію. Вони також мають різні розміри та форму. Розташовувались у всіх компонентах пухлинної тканини (рис. 3.17).

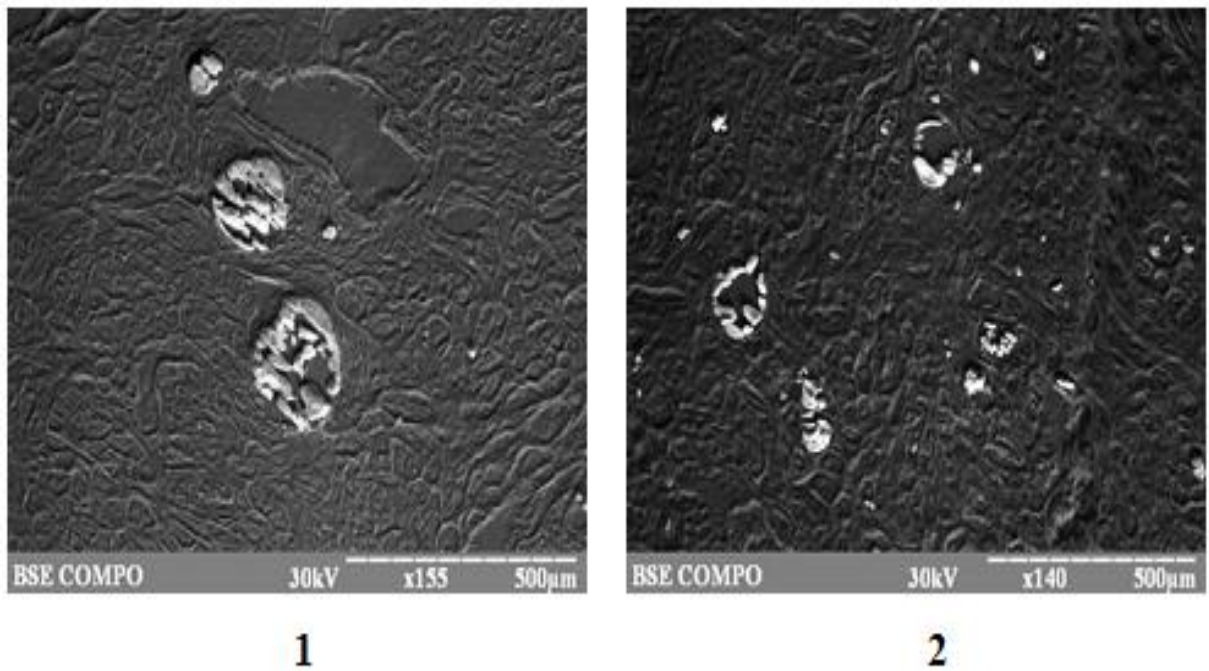


Рис. 3.17. Растрова електронна мікроскопія мінералізованої тканини ІПРМЗ при оптичному збільшенні  $\times 155$  (1) та  $\times 140$  (2).

Вивчення мікроелементного складу біомінералізату показало, що поряд з значним вмістом кальцію та фосфору у його структурі містяться такі мікроелементи як Fe, Zn, Cu, Cr та Ni (рис.3.18).

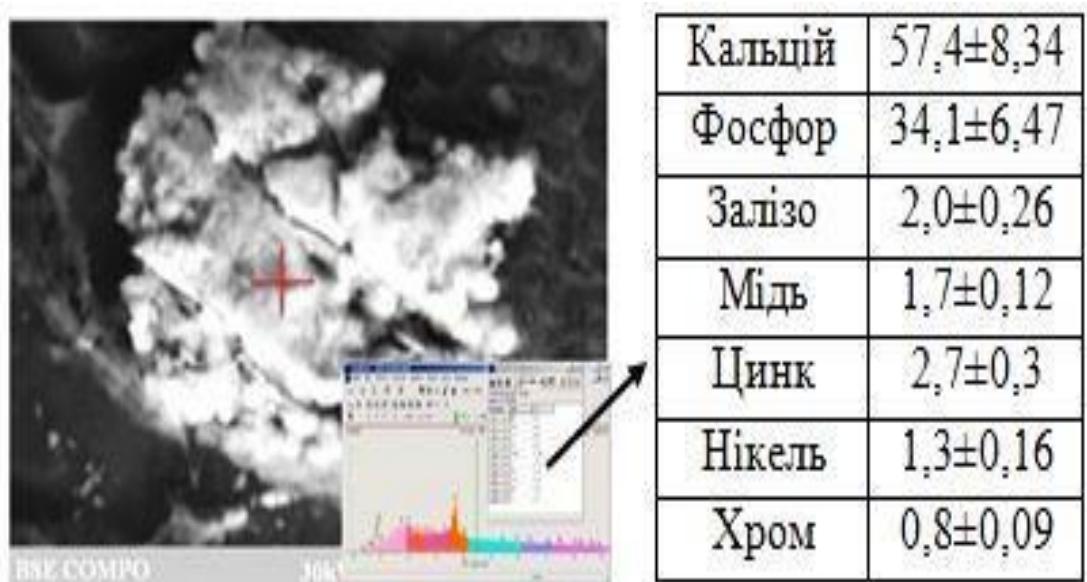


Рис. 3.18. Сканограма та хімічний склад біомінералізату.

Збільшення  $\times 1360$ .

Враховуючи кальцієво-фосфорне співвідношення (за даними енерго-дисперсійної спектрометрії), яке дорівнює 1,56-1,73, можна стверджувати, що мінералізати пухлинної тканини є не що інше, як відкладання ГА. Присутність вищезазначених ВМ у складі мінералізату говорить про здатність їх вступати у взаємозв'язки з молекулами ГА. В цьому випадку можна припустити, що такі МЕ як Fe, Zn, Cu, Cr та Ni заміщують іони кальцію у молекулі ГА.

При порівнянні імунної реакції в навколопухлинному просторі з мікроелементним складом пухлинної тканини встановлено синхронне зростання показників ( $r=0,19$ ,  $p=0,034$ ), що може вказувати на участь ВМ в ініціюванні та пролонгації запальної інфільтрації тканини ІПРМЗ.

Аналізуючи результати атомно-абсорбційної спектрофотометрії та енерго-дисперсійної спектрометрії, можна констатувати факт наявності ВМ у складі пухлин МЗ. Істотна відмінність у їх кількості у двох групах дослідження вказує на вплив навколишнього середовища на рівень вмісту цих елементів у неопластичній тканині.

Наявність взаємозв'язків між кількістю ВМ у тканині ІПРМЗ та ступенем диференціювання пухлин і рівнем імунної відповіді вказує на участь підвищеного екзогенного надходження СВМ у прогресуванні неопластичного процесу.

Дані, стосовно вивчення складу мінераліватів, показали, що вони представлені ГА, і до їх складу також входять ВМ, що слугує доказом участі останніх у прогресуванні патологічної біомінералізації неопластичної тканини МЗ.

### **3.4. ІГХ дослідження рецепторів у пухлинній тканині.**

#### **3.4.1. Дослідження ER, PR, HER2/neu, p53, Ki-67 та bcl-2 рецепторів у пухлинній тканині жінок з «екологічно-забруднених» районів**

При розподілі ІПРМЗ на молекулярно-генетичні підгрупи нами враховувалася експресія рецепторів до естрогену, прогестерону та епідермального фактору росту.

Стероїд-позитивною вважалась реакція за умови наявності позитивно-забарвлених ядер. В окремих випадках мала місце позитивна цитоплазматична реакція на барвник з боку ракових клітин. Її ми не враховуємо, вважаючи за псевдопозитивну реакцію, яка виникає при взаємодії хромогену з цитоплазматичним компонентом клітин, хоча в окремих дослідженнях показано аналіз цієї реакції на наявність внутрішньоклітинних цитоплазматичних ER. В наших дослідженнях встановлено, що реакція у кожному окремому випадку різна. Це залежить як від кількості рецептор-позитивних клітин, так і від інтенсивності забарвлення ядер. В залежності від цього рецепторний статус тканини вважали негативним, слабопозитивним, помірнопозитивним та сильнопозитивним (рис 3.19).

У табл. 3.5 наведено показники експресії ER у тканині ІПРМЗ дослідницької групи. В окремих випадках експресія рецепторів в одній і тій же тканині ІПРМЗ характеризувалась гетерогенністю реакції – присутня як рецептор-позитивна, так і рецептор-негативна тканина, що вказує на лабільність рецепторного фенотипу пухлинних клітин, на яку може впливати як заплановане лікування, так і якісні та кількісні показники пухлинного мікрооточення.

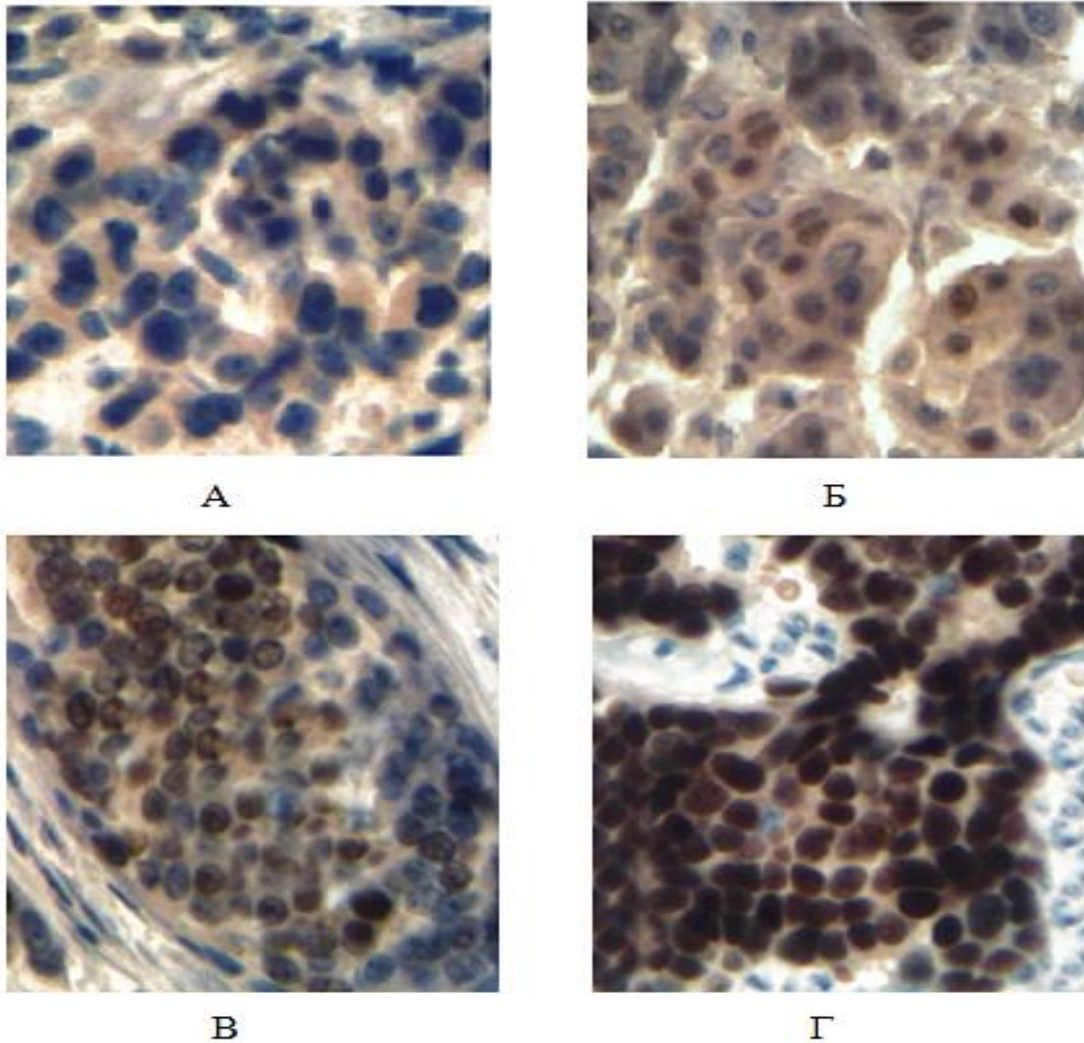


Рис. 3.19. Варіанти експресії стероїдних рецепторів у тканині ІПРМЗ. А – негативна реакція, Б – слабопозитивна реакція, В – помірнопозитивна реакція, Г – сильнопозитивна реакція.

ІГХ дослідження експресії ER. Збільшення  $\times 400$ .

У досліджуваній тканині мала місце незначна реакція з боку стромального компоненту, що вказує на синхронну реакцію пухлини, як з боку паренхіми, так і строми, на дію стероїдних гормонів, хоча взаємозв'язку між цими показниками не виявлено. Це є індикатором того, що в процесі прогресування неопластичного процесу відбувається роз'єднання між чутливістю двох складових пухлини, що в більшості випадків пов'язано з набуттям раковими клітинами нових рецепторних властивостей.

Таблиця 3.5

## Експресія ER у тканини ІПРМЗ дослідницької групи

Рецепторний статус	Сума балів за D.C.Allred	Кількість випадків	Відсоток від загального
Негативний	0-2	16	26%
Слабопозитивний	3	8	26%
	4	8	
Помірнопозитивний	5	8	20%
	6	4	
Сильнопозитивний	7	6	28%
	8	11	

Присутність PR, що вказує на більшу чутливість до терапії та кращий прогноз, виявлялась у 80% (36 зразків) естроген-позитивних випадків ІПРМЗ дослідницької групи. Випадків PR+ статусу клітин за умови відсутності ER не виявлено. Ця закономірність вказує на залежність наявності PR від чутливості ракових клітин до естродіолу. Реакція вважалась позитивною при забарвленні більше 1% клітин будь якого ступеня інтенсивності (як і у випадку дослідження ER). Так, негативна реакція була присутня у 25 випадках (41%), слабопозитивна – 18 випадках (30%), помірнопозитивна – 11 зразках (18%) та сильнопозитивна реакція – у 7 випадках (11%) ІПРМЗ у жінок з «екологічно-забруднених» районів області.

За результатами дослідження виявлено сильний позитивний кореляційний зв'язок ( $r=0,8$ ) між експресією ER та PR. Дослідження взаємозв'язку між ступенем диференціювання ІПРМЗ та стероїдним статусом клітин виявив сильний негативний кореляційний зв'язок між експресією ER та рівнем злоякісності пухлини ( $r=-0,74$ ); помірний негативний кореляційний зв'язок між наявністю PR та G-статусом неоплазії ( $r=-0,58$ ). Вищезазначене підтверджує відомості про зниження стероїд-рецепторного статусу клітин при прогресуванні злоякісного процесу.

Особливої уваги потребувало вивчення взаємозв'язку між наявністю рецепторів до стероїдних гормонів та наявністю запальної інфільтрації в пухлинному мікрооточенні, як фактору, який може впливати на фенотип ракових клітин. Встановлено слабкий негативний кореляційний зв'язок між експресією ER тканиною ППМЗ та наявністю імунної реакції навколо пухлинних клітин ( $r=-0,35$ ), що вказує хоч і не на значний, але все ж таки вплив запалення на рецепторний фенотип клітин ПМЗ.

При встановленні HER2/neu профілю пухлинної тканини враховувалась наявність мембранного забарвлення пухлинних клітин. HER2/neu+ вважалась тканина, яка містила більше 10% клітин, які мали дуже інтенсивну мембранну реакцію у вигляді товстої лінії з формуванням повного обідка навколо більшості клітин, доволі часто присутня сильна дифузна цитоплазматична реакція (рис. 3.20).

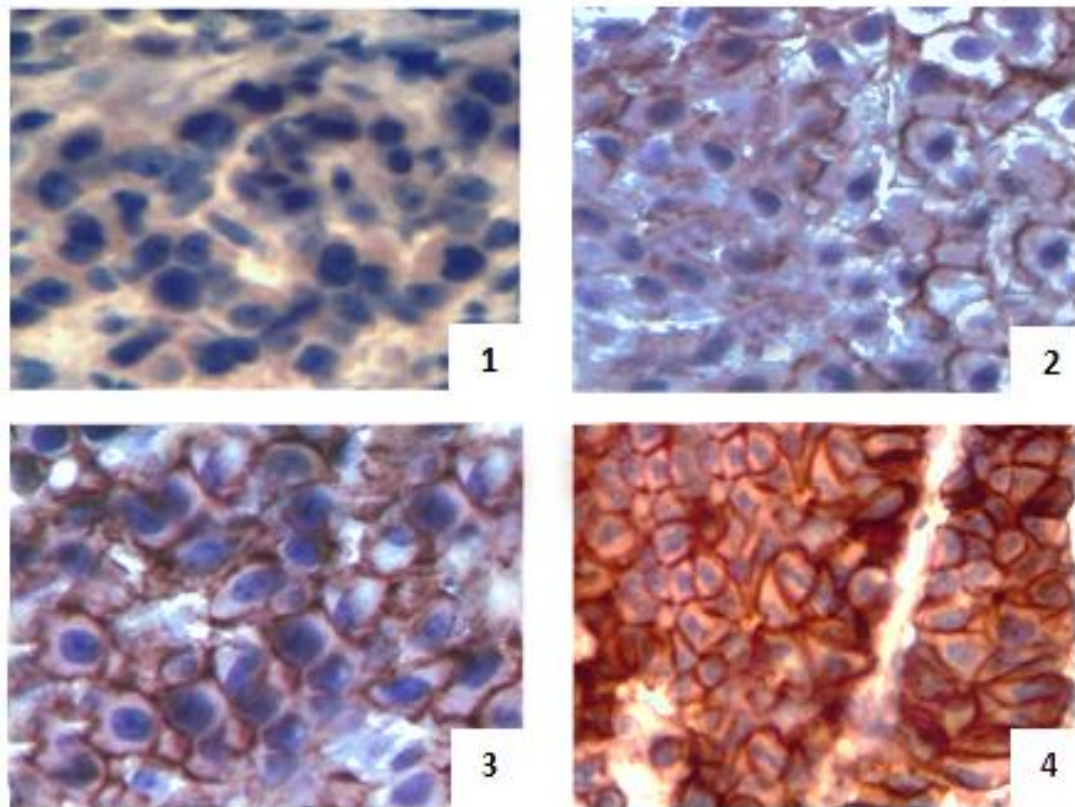


Рис. 3.20. Тканина ППМЗ низького ступеня диференціювання.

1 – негативна реакція (0), 2 – негативна реакція (1+), 3 – сумнівна реакція (2+), 4 – позитивна реакція (3+).

ІГХ дослідження експресії HER2/neu. Збільшення  $\times 400$ .

Окремо цитоплазматичне та/або ядерне забарвлення не являлися ознаками, які розцінювалися як позитивна реакція. Всі інші випадки ми розподілили на 2 групи: негативна реакція (0 та 1+) та сумнівна реакція (2+). В останньому випадку HER2/neu профіль встановлювався за допомогою FISH дослідження, яке вважається «золотим» стандартом у діагностиці ампліфікації гену, що кодує HER2/neu рецептори.

У групі жінок з «екологічно-забруднених» районів результати виявилися наступними: 14 випадків (23%) виявилися HER2/neu позитивними, з яких у 2-ох випадках ампліфікація гену була доведена за допомогою FISH дослідженні, у 47 зразках (77%) реакція щодо наявності рецепторів до епідермального фактору росту виявилася негативною, з них 1 випадок встановлено за допомогою флуоресцентної гібридизації *in situ*.

Встановлено негативний помірний кореляційний зв'язок ( $r=-0,54$ ) між наявністю рецепторів до стероїдних гормонів та виявленням HER2/neu рецепторів. У табл. 3.6 наведено розподіл всіх випадків ІПРМЗ на молекулярно-генетичні типи, враховуючи експресію вищезазначених рецепторів.

Таблиця 3.6

Розподіл тканини ІПРМЗ першої групи на молекулярно-генетичні типи

Фенотип пухлини	Критерії діагнозу	Кількість випадків	Відсоток від загального
Люмінальний тип А	ER+ PR+/- HER2/neu-	40	66
Люмінальний тип В	ER+ PR+/- HER2/neu+	5	8
HER2/neu позитивний тип	ER- PR- HER2/neu+	9	15
Потрійний негативний тип	ER- PR- HER2/neu-	7	11

Як і у випадку експресії ER та PR при визначенні HER2/neu були присутні випадки з гетерогенною реакцією, що вказує на мінливість рецепторного фенотипу ракової тканини при прогресуванні неопластичного процесу (рис 3.21).

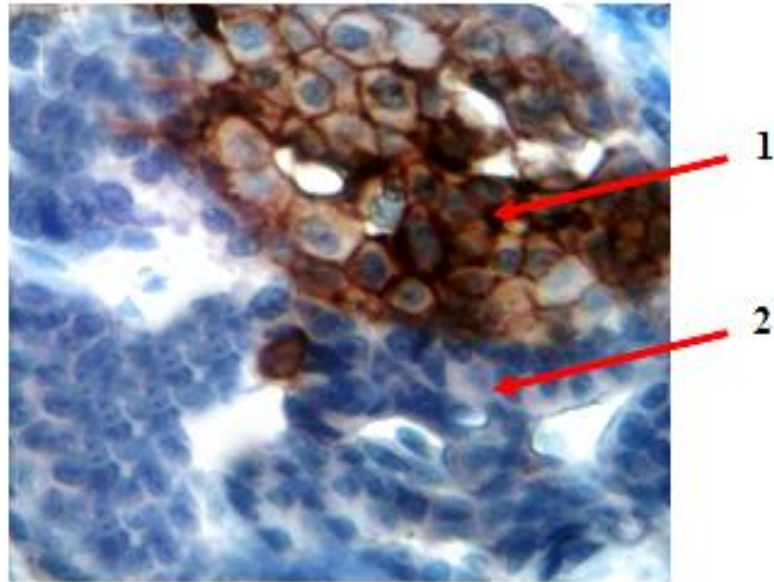


Рис. 3.21. Гетерогенна мембранна реакція в тканині ІПРМЗ помірного ступеня диференціювання. 1 – HER2/neu+ клітини, 2 – HER2/neu- клітини.

ІГХ дослідження експресії HER2/neu. Збільшення  $\times 400$ .

В одних випадках це пов'язано з мутаціями (ампліфікація) гену, в інших з варіабельністю пухлинного мікрооточення, яке через проміжні ланки регулювання транскрипції, трансляції та конфірмацийного регулювання змінює рецепторний статус клітин, надаючи клітинам нових агресивних властивостей.

При вивченні експресії вище згадуваних рецепторів у лімфатичних вузлах результати виявилися наступними – в усіх випадках стероїд-позитивний профіль пухлинної тканини у метастазі співпадав зі статусом рецепторів в первинному вогнищі, хоча в 3 випадках рівень експресії був меншим (4, 3 та 2 бали), ніж у вогнищі МЗ (7, 6 та 4 балів відповідно). Це говорить про придбання нових якостей метастатичної тканини в процесі прогресування, яке проходить у вогнищах відсіву РМЗ. HER2/neu-

позитивний та HER2/neu-негативний статус тканини у первинному вогнищі співпадали з відповідними результатами у метастазах.

Аналіз результатів вивчення мікроелементного складу тканини ППРМЗ та експресії рецепторів до естрогену, прогестерону та епідермального фактору росту показав негативний кореляційний зв'язок між накопиченням ВМ у пухлинній тканині та рівнем експресії ER ( $r=-0,7$ ) та PR ( $r=-0,59$ ). Що стосується рецепторів HER2/neu, то результати виявилися протилежними ( $r=0,36$ ). Це вказує на вплив ВМ на наявність у клітинах ППРМЗ найбільш потужних прогностичних рецепторів, який може реалізовуватись як через безпосередній вплив на них, так і через проміжні ланки інгібування транскрипції гену естрогену та HER2/neu.

Проліферативна активність ракових клітин оцінювалась за допомогою виявлення позитивно-забарвлених клітин при дослідженні рецепторів Ki-67. Позитивна реакція вказувала на вихід клітини з  $G_0$  фази клітинного циклу, тобто клітина знаходилась або в стані поділу (M фаза), або в фазах премітотичної підготовки ( $G_1$ , S або  $G_2$  фази). Це вказує на можливість оцінити не тільки наявність клітин безпосередньо приймаючих участь у поділі, що можна виявити і на гістологічних препаратах, а й визначити прихований проліферативний потенціал тканини ППРМЗ.

У більшості випадків проліферативний потенціал в оточуючій відносно-нормальній тканині МЗ був нижчий за той, що виявлений у пухлинній тканині (рис. 3.22). Натомість, показники експресії Ki-67 у метастатичних вогнищах перевищували ті, що виявлені у первинному вогнищі.

При дослідженні тканини РМЗ жінок першої групи встановили, що у 85% (52 випадки) реакція щодо присутності рецепторів Ki-67 була позитивною (кількість позитивно-забарвлених пухлинних клітин (n) більше 1% у 10 полях зору при збільшенні мікроскопу  $\times 400$ ), з них у 16 випадках (26%) реакцію вважали слабкопозитивною ( $1\% < n < 14\%$ ), у 22 випадках (30%) – помірнопозитивною ( $14\% < n < 30\%$ ) та у 14 випадках (23%) встановлено

сильнопозитивну реакцію ( $30\% < n < 100\%$ ) щодо наявності білка Ki-67 в ядрі ракових клітин.

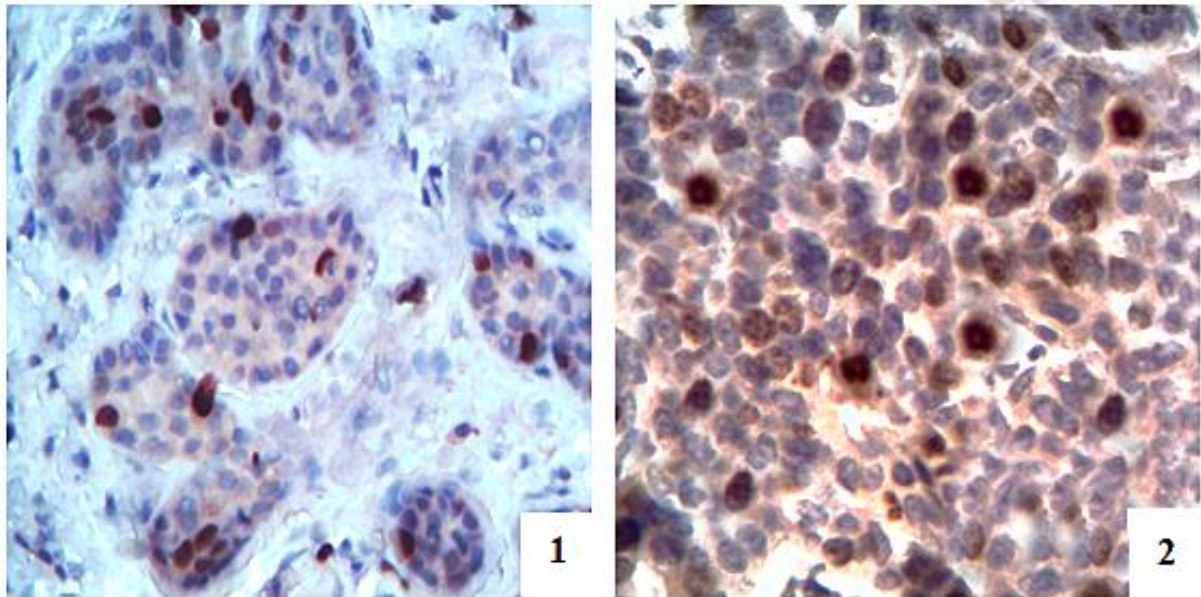


Рис. 3.22. Експресія рецепторів Ki-67 у тканині МЗ. Позитивна ядерна реакція у клітинах МЗ. 1 – інтактна тканина, 2 – тканина ІПРМЗ.

ІГХ дослідження експресії Ki-67. Збільшення  $\times 400$ .

Аналізуючи дані хімічного аналізу та ІГХ дослідження тканини ІПРМЗ, встановлено помірний кореляційний зв'язок ( $r=0,51$ ) між показниками експресії білка Ki-67, що дорівнює кількості проліферативного пулу пухлини, та вмістом ВМ у раковій тканині, що вказує на безпосередню участь останніх у стимуляції поділу клітин ІПРМЗ. Негативний кореляційний зв'язок між Ki-67 та ER ( $r=-0,37$ ) і PR ( $r=-0,33$ ) говорить про поєднання зростання проліферативного потенціалу пухлинних клітин з втратою рецепторів до стероїдних гормонів.

Враховуючи експресію білка Ki-67, вищезазначена молекулярно-генетична класифікація ІПРМЗ першої групи, яка враховує проліферативний потенціал тканини, зазнала деякої видозміни (табл. 3.7).

Люмінальний тип А був розподілений на, знову ж таки, люмінальний тип А (17 випадків – 28%) за умови рівня експресії Ki-67  $< 14\%$  та

люмінальний тип В HER2/neu негативний (23 випадки – 38%) при виявленні проліферативної активності у 14% та більше відсотках пухлинних клітин.

Таблиця 3.7

Молекулярно-генетична класифікація ІПРМЗ першої групи з урахуванням проліферативного потенціалу тканини

Фенотип пухлини	Критерії діагнозу	Кількість випадків	Відсоток від загального
Люмінальний тип А	ER+ PR+/- HER2/neu- Ki-67<14%	17	28
Люмінальний тип В HER2/neu негативний	ER+ PR+/- HER2/neu- Ki-67≥14%	23	38
Люмінальний тип В HER2/neu позитивний	ER+ PR+/- HER2/neu+ Ki-67≥14%	5	8
HER2/neu позитивний тип	ER- PR- HER2/neu+	9	15
Потрійний негативний тип	ER- PR- HER2/neu-	7	11

При вивченні проапоптичного та антиапоптичного потенціалів клітин РМЗ нами досліджено експресію білків p53 та bcl-2. Як показують результати дослідження патерном експресії (складовою клітини, забарвлення якої ДАБом оцінюється за позитивну реакцію) білка p53 виступає ядро.

У першій групі отримані наступні результати: 28 випадків (46%) тканини ІПРМЗ були p53-позитивними (інтенсивне забарвлення більше 5% ядер або помірно забарвлення від 10% до 50% ядер клітин), серед яких у 8 зразках (13%) мала місце слабкопозитивна реакція (5%<n<20%), у 14 випадках

(23%) – помірно-позитивна реакція ( $20\% < n < 50\%$ ) та у 6 зразках (10%) нами встановлена сильно-позитивна реакція ( $50\% < n < 100\%$ ) на наявність антиапоптичного білка p53.

Аналогічно до результатів експресії Ki-67 при вивченні рецепторів p53 у віддалених метастазах встановлено, що їх рівень перевищував знайдені показники у первинному вогнищі, хоча й мав ту ж закономірність – при наявності в тканині РМЗ вони завжди присутні у віддалених метастазах (рис. 3.23). Це вказує на однорідність пухлинної тканини та здатність до прогресування в процесі поширення по організму.

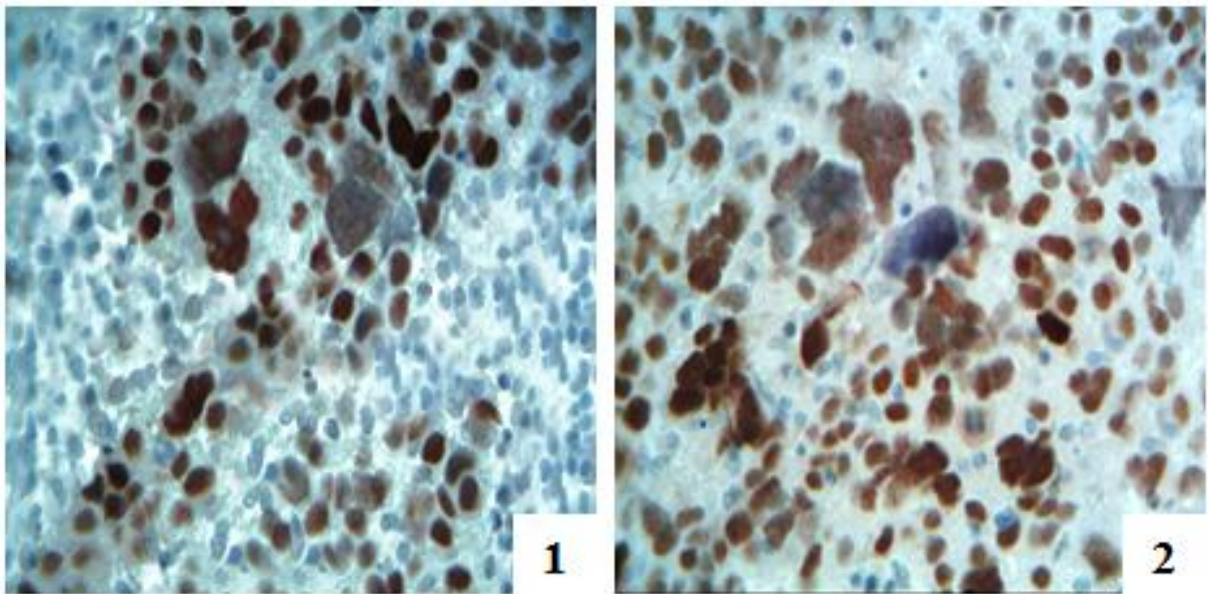


Рис. 3.23. Експресія рецепторів p53 у тканині РМЗ.

Наявна інтенсивна ядерна реакція у ракових клітинах. 1 – первинне вогнище раку, 2 – метастатична тканина.

ІГХ дослідження експресії p53. Збільшення  $\times 400$ .

Незважаючи на данні про відсутність експресії p53 в нормальній тканині МЗ нами встановлено поодинокі випадки наявності p53-позитивних клітин у незмінній МЗ. Але можливості встановити до якого саме типу p53 (wt p53 чи mt p53) не було. Виявлено закономірність підвищення експресії p53 у результаті набуття раковими клітинами виражених поліморфних

властивостей: патологічні мітози, збільшення розмірів, збільшення індексу Гертвіга та інші.

При порівнянні даних експресії білків p53 та Ki-67 встановлено позитивний кореляційний зв'язок ( $r=0,49$ ) між двома показниками. Це вказує на взаємозв'язок між підвищенням проліферативної активності та збільшенням внутрішньоклітинного mt p53. Тобто в процесі канцерогенезу участь ВМ може бути пусковим механізмом, який в подальшому підтримується аутогенними патологічними механізмами. За умови підвищення потенціалу клітини до поділу під впливом екзогенних чинників при умові відсутності проапоптичного блоку збільшується кількість мутацій, в тому числі і гену p53, які в подальшому знову провокують поділ клітин.

На противагу вищезазначеному експресія пухлинними клітинами білка bcl-2 є прямим індикатором антиапоптозного потенціалу клітин. Патерном експресії виступає цитоплазма (рис 3.24). Для ІПРМЗ першої групи тканин характерні наступні результати: у 41% випадків (25 зразків) встановлена позитивна реакція на наявність антиапоптичних рецепторів, 36 зразків (59%) були bcl-2-негативними. Результати дослідження показують, що bcl-2-позитивні випадки ІПРМЗ у 92% випадків (23 зразки) супроводжувались наявністю ER, що не є випадковою обставиною, враховуючи той факт, що ген Bcl-2 є естрогензалежним, і його транскрипція відбувається за умов надходження сигналів від ER. Звісно, естрогензалежна регуляторна система активності синтезу bcl-2 не є єдиною ланкою впливу, про що свідчать ER- та bcl-2+ випадки ІПРМЗ. Взаємозв'язку між експресією bcl-2 рецепторів та білків HER2/neu і Ki-67 не виявлено ( $r<0,25$ ).

При дослідженні взаємозв'язку між двома регуляторними білками апоптозу (bcl-2 та p53) встановлено позитивний кореляційний зв'язок ( $r=0,34$ ). Це вказує на, хоча і слабкий, взаємозв'язок між двома регуляторними системами апоптозу. При підвищеній кількості mt p53 зменшується супресорний вплив на активацію апоптозу за рахунок

блокування синтезу wt p53, який пригнічує синтез антиапоптичного білка bcl-2.

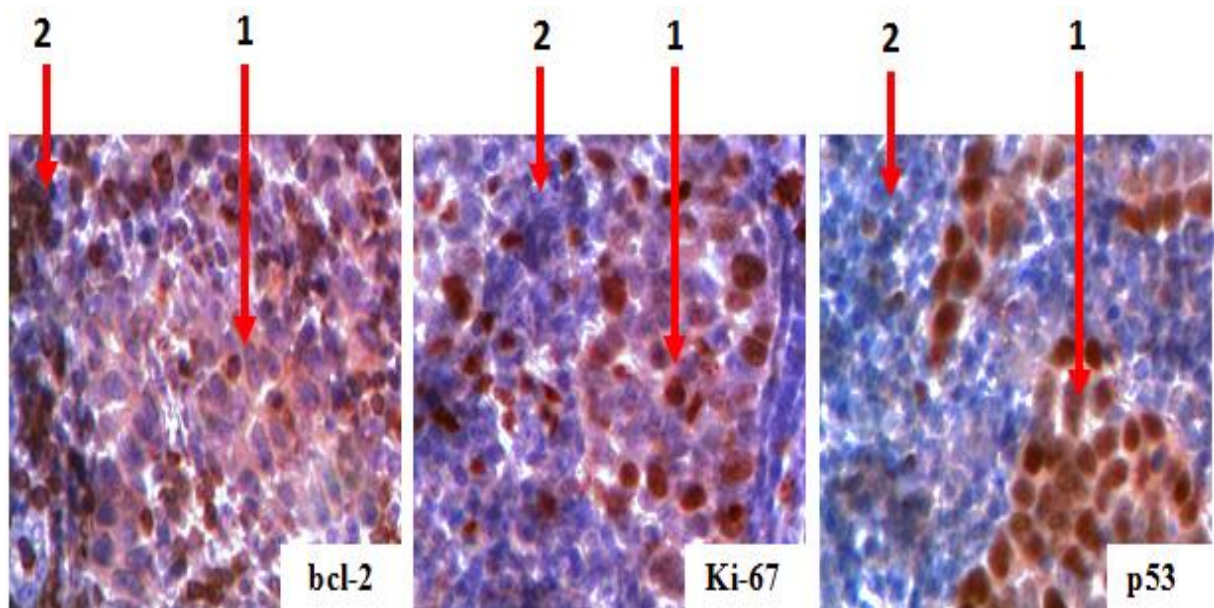


Рис. 3.24. ІПРМЗ низького ступеня диференціювання з інтенсивною запальною реакцією в стромі. Наявна позитивна експресія рецепторів bcl-2 (патерн – цитоплазма), Ki-67 та p53 (патерн – ядро).

1 – пухлинна тканина, 2 – міжклітинний імунний інфільтрат.

ІГХ дослідження експресії bcl-2, Ki-67 та p53. Збільшення  $\times 400$ .

При співставленні даних атомної спектрофотометрії по вивченню мікроелементного складу тканини ІПРМЗ з даними імуногістохімічного дослідження виявлено кореляційну залежність між кількістю білка bcl-2 та вмістом VM ( $r=0,29$ ), що говорить про пряму антиапоптичну дію VM щодо апоптозу пухлинних клітин. Встановлено, також, що із зростанням кількості VM підвищується кількість mt p53 ( $r=0,31$ ), що призводить до блоку апоптозу та репарації ДНК, що запускає вищезгаданий механізм регуляції поділу клітин. Тобто, утворення патологічного білка p53 може бути як первинним процесом, так і результатом підвищеної проліферативної активності клітин.

Іншим варіантом впливу VM на антиапоптичну спроможність клітин є її опосередкований вплив через синтез mt p53 та підвищення проліферативної активності клітин, враховуючи факт залежності ступеню проліферативної

активності від мікроелементного складу тканини РМЗ. Зростання мітотичної активності викликає мутації генетичного матеріалу, за рахунок відсутності проапоптичного та репаративного блоку, синтезу mt p53 та активацію функції bcl-2 протеїну. Саме це підтверджується виявленням у 60% bcl-2-позитивного ІПРМЗ наявності експресії p53 та Ki-67 (рис 3.24).

У табл. 3.8 представлені зведені дані взаємозв'язку між вищезазначеними рецепторами тканини ІПРМЗ першої групи між собою та мікроелементним складом пухлини.

Таблиця 3.8

*Взаємозв'язок між показниками експресії рецепторів тканиною ІПРМЗ дослідницької групи та елементним складом пухлини, враховуючи коефіцієнт кореляції Пірсона (r)*

	<b>BM</b>	<b>ER</b>	<b>PR</b>	<b>HER2</b>	<b>Ki-67</b>	<b>p53</b>	<b>bcl-2</b>
<b>BM</b>		-0,7	-0,59	0,36	0,51	0,31	0,29
<b>ER</b>	-0,7		0,8	-0,54	-0,37	-0,06	0,44
<b>PR</b>	-0,59	0,8		-0,55	-0,33	-0,08	0,33
<b>HER2</b>	0,36	-0,54	-0,55		0,1	-0,05	-0,23
<b>Ki-67</b>	0,51	-0,37	-0,33	0,1		0,49	-0,05
<b>p53</b>	0,31	-0,06	-0,08	-0,05	0,49		0,34
<b>bcl-2</b>	0,29	0,44	-0,23	-0,23	-0,05	0,34	

Показник (критичний) коефіцієнта кореляції Пірсона (r) при рівні значимості  $p \leq 0,05$  для вибірки  $n=61$  дорівнює 0,25

Аналізуючи дані імуногістохімічного дослідження рецепторів у пухлинній тканині жінок, які мешкають у «екологічно-забруднених» районах Сумської області, можна ствержувати, що неопластична тканина має у більшості випадків стероїд-позитивний профіль, різний ступінь проліферативної активності клітин та варіабельну здатність до апоптозу.

Встановлені кореляційні зв'язки між кількістю ВМ у неопластичній тканині та рівнем експресії рецепторів вказують на негативний вплив останніх на перебіг пухлинного процесу в МЗ. Взаємозв'язки між експресіями рецепторів слугують підтвердженням сонхронності прогресування ІПРМЗ.

### **3.4.2. Дослідження ER, PR, HER2/neu, p53, Ki-67 та bcl-2 рецепторів у пухлинній тканині жінок з «екологічно-чистих» районів**

При дослідженні ER у другій групі порівняння тканин ІПРМЗ виявлено, що у 5 випадках (15%) реакція була негативною, у 7 зразках (21%) – слабопозитивною, у 5 випадках (15%) – помірнопозитивною та у 16 зразках (49%) виявлена сильнопозитивне ІГХ забарвлення ракових клітин. Розподіл результатів щодо експресії PR встановлено наступний: 11 випадків (33%) – негативна реакція, 7 випадків (21%) – слабопозитивна реакція, 7 випадків (21%) – помірнопозитивна реакція, 8 випадків (25%) – сильнопозитивна реакція. В окремих випадках, як і у випадку дослідження першої групи тканин, виявлена гетерогенна реакція з боку пухлинних клітин та поодинокі випадки стромальної реакції.

Результати ІГХ дослідження рецепторів епідермального фактору росту показали HER2/neu-позитивний статус у 5 випадках (15%) та HER2/neu-негативний – у 28 (85%) зразках ІПРМЗ. З них по одному випадку було верифіковано при FISH дослідженні сумнівних (2+) випадків пухлинної тканини. Спостерігались випадки з вогнищевою гетерогенною реакцією.

Враховуючи експресію вищезазначених рецепторів виявлено, що до люмінального типу А відноситься 27 випадків (82%) ІПРМЗ, до люмінального типу Б – 1 випадок (3%), до HER2/neu позитивного типу – 4 випадки (12%) та до потрійного негативного типу – 1 випадок (3%).

При дослідженні проліферативного потенціалу пухлинної тканини у 4 випадках (12%) встановлена негативна реакція, а у 29 (88%) зразках вона була позитивною. Ki-67-позитивна реакція була розподілена на 3 групи: 9 –

слабопозитивна реакція, 13 – помірнопозитивна реакція, 8 – сильнопозитивна реакція.

Враховуючи експресію білка Ki-67, вищезазначена молекулярно-генетична класифікація ІПРМЗ групи порівняння, яка враховує проліферативний потенціал тканини, також, зазнала видозміни (табл. 3.9). Люмінальний тип А був розподілений на люмінальний тип А (13 випадків – 39,5%) та люмінальний тип В HER2/neu негативний (14 випадки – 42.5%).

Таблиця 3.9

Молекулярно-генетична класифікація ІПРМЗ другої групи з урахуванням проліферативного потенціалу тканини

Фенотип пухлини	Критерії діагнозу	Кількість випадків	Відсоток від загального
Люмінальний тип А	ER+ PR+/- HER2/neu- Ki-67<14%	13	39,5
Люмінальний тип В HER2/neu негативний	ER+ PR+/- HER2/neu- Ki-67≥14%	14	42,5
Люмінальний тип В HER2/neu позитивний	ER+ PR+/- HER2/neu+ Ki-67≥14%	1	3
HER2/neu позитивний тип	ER- PR- HER2/neu+	4	12
Потрійний негативний тип	ER- PR- HER2/neu-	1	3

У групі порівняння p53-позитивний рецепторний профіль виявлений у 10 зразках (30%) пухлинної тканини, та у 23 випадках (70%) реакція була

негативною. Серед позитивних випадків слабка реакція встановлена у 4 зразках (12%), помірна – також у 4 зразках (12%), сильна – у 2 випадках (6%).

При ІГХ дослідженні bcl-2-позитивний профіль ракових клітин виявлений у 15 випадках (46%), bcl-2-негативні – у 18 випадках (55%).

Порівняльний аналіз експресії рецепторів між двома групами дослідження наведено в таблиці 3.10.

Таблиця 3.10

Порівняльний аналіз експресії рецепторів між двома групами дослідження, враховуючи критерій Стьюдента (t) та ступінь надійності (p)

	ER	PR	HER2/neu	Ki-67	p53	bcl-2
t	1,95	1,53	0,89	0,26	1,52	0,26
p	0,026	0,064	0,18	0,4	0,066	0,4

Згідно табличних даних має місце статистично достовірною різниця між наявністю рецепторів до стероїдних гормонів в обох групах, що вказує на рецептор-інгібуючий вплив підвищеного надходження СВМ до організму жінок, які мешкають в «екологічно-забруднених» районах Сумської області. Хоча і не виявлено достовірного зв'язку між експресією PR, HER2/neu, Ki-67, p53, bcl-2 та місцем проживання хворих у першій та другій групі, треба відмітити, що PR-позитивні випадки у другій групі зустрічалися на 8% частіше ніж у першій групі, HER2/neu-позитивні – на 8% рідше, p53-позитивні – на 16% частіше.

Важливою частиною роботи, як і у випадку першої групи, є встановлення взаємозв'язку між накопиченням ВМ в тканині МЗ та експресією прогностично-важливих маркерів РМЗ.

В табл. 3.11 представлені зведені дані взаємозв'язку між вищезазначеними рецепторами тканини ІПРМЗ групи порівняння та мікроелементним складом пухлини.

У ході статистичної обробки результатів встановлено сильний кореляційний зв'язок ( $r=0,79$ ) між експресією ER та PR, ER та HER2/neu ( $r=-0,76$ ); помірний кореляційний зв'язок між кількістю VM та Ki-67 ( $r=0,52$ ), ER та Ki-67 ( $r=-0,6$ ), PR та HER2/neu ( $r=-0,55$ ), PR та Ki-67 ( $r=-0,52$ ), Ki-67 та p53 ( $r=0,54$ ); слабкий кореляційний зв'язок між VM та ER ( $r=-0,43$ ), VM та PR ( $r=-0,43$ ), VM та p53 ( $r=0,45$ ), ER та p53 ( $r=-0,48$ ), PR та p53 ( $r=-0,4$ ), HER2/neu та Ki-67 ( $r=0,38$ ).

Таблиця 3.11

Взаємозв'язок між показниками експресії рецепторів тканиною ІПРМЗ групи порівняння та елементним складом пухлини, враховуючи коефіцієнт кореляції Пірсона ( $r$ )

	<b>VM</b>	<b>ER</b>	<b>PR</b>	<b>HER2</b>	<b>Ki-67</b>	<b>p53</b>	<b>bcl-2</b>
<b>VM</b>		-0,43	-0,43	0,14	0,52	0,45	0,12
<b>ER</b>	-0,43		0,79	-0,76	-0,6	-0,48	0,23
<b>PR</b>	-0,43	0,79		-0,55	-0,52	-0,4	0,01
<b>HER2</b>	0,14	-0,76	-0,55		0,38	0,3	-0,21
<b>Ki-67</b>	0,52	-0,6	-0,52	0,38		0,54	0,01
<b>p53</b>	0,45	-0,48	-0,4	0,3	0,54		0,25
<b>bcl-2</b>	0,12	0,23	0,01	-0,21	0,01	0,25	

Показник (критичний) коефіцієнта кореляції Пірсона ( $r$ ) при рівні значимості  $p \leq 0,05$  для вибірки  $n=33$  дорівнює 0,32

Також, встановлена тенденція між зростанням рівнів експресії p53 та bcl-2 рецепторів, значеннями HER2/neu та p53. у 93% bcl-2-позитивного фенотипу ракових клітин мала місце наявність рецепторів до стероїдних гормонів.

Отже основні взаємозв'язки між експресією рецепторів та елементним складом пухлинної тканини зберігаються і в другій групі, що вказує на

спільні механізми прогресування неопластичної тканини при зростанні у ній кількості ВМ. ВМ сприяють експресії прогностично-несприятливих та інгібують експресію прогностично-сприятливих рецепторів у непластичній тканині.

### **3.4.3. Вивчення експресії MGMT, MMP1 та E-кадгерину у пухлинній тканині.**

При вивченні експресії репаративного ензиму MGMT, як і всіх інших білків, які будуть описані нижче, дослідження проводилося з урахуванням наявності чи відсутності певних особливостей (варіабельність хімічного складу, гістологічні особливості та інші). Так для вивчення особливостей цього ферменту було відібрано 20 випадків з високими показниками вмісту ВМ в тканині ІПРМЗ (від 80,02мкг/г до 84,86мкг/г, в середньому  $82,31 \pm 1,27$ мкг/г) з першої групи та 20 випадків з відносно низьким вмістом цих же елементів (від 51,21мкг/г до 64,1мкг/г, в середньому  $57,84 \pm 4,79$ мкг/г) з другої групи. Патерном експресії виступають, згідно рекомендацій виробника антитіл, цитоплазма та ядро. У наших дослідженнях отримано більш яскраво виражену ядерну локалізацію MGMT (рис 3.25), хоча в деяких випадках присутня і цитоплазматична експресія репаративного ензиму.

Це підтверджує основну функцію білка MGMT, який переносить алкільний залишок (метил-, етил-, н-пропіл- та інші) від  $O^6$ -позиції гуаніну ДНК на свій активний 145-й цистеїновий акцепторний сайт, що, відповідно, відбувається в ядрі ракових клітин. Випадків, в яких патерном експресії виступала б тільки цитоплазма, нами встановлено не було.

У ході дослідження нами були виявлені наступні результати: 17 випадків (42,5%) ІПРМЗ були MGMT-позитивними, а 23 зразки (57,5%) – MGMT-негативними. Серед рецептор-позитивних випадків 11 (65%) мали місце в групі з підвищеною кількістю ВМ у тканині РМЗ та 6 (35%) – у пухлинній тканині з відносно низьким вмістом вищезазначених елементів.

Цитоплазматична експресія MGMT була виявлена майже у 30% випадків (5 зразків): 3 випадки в першій групі та 2 – в другій.

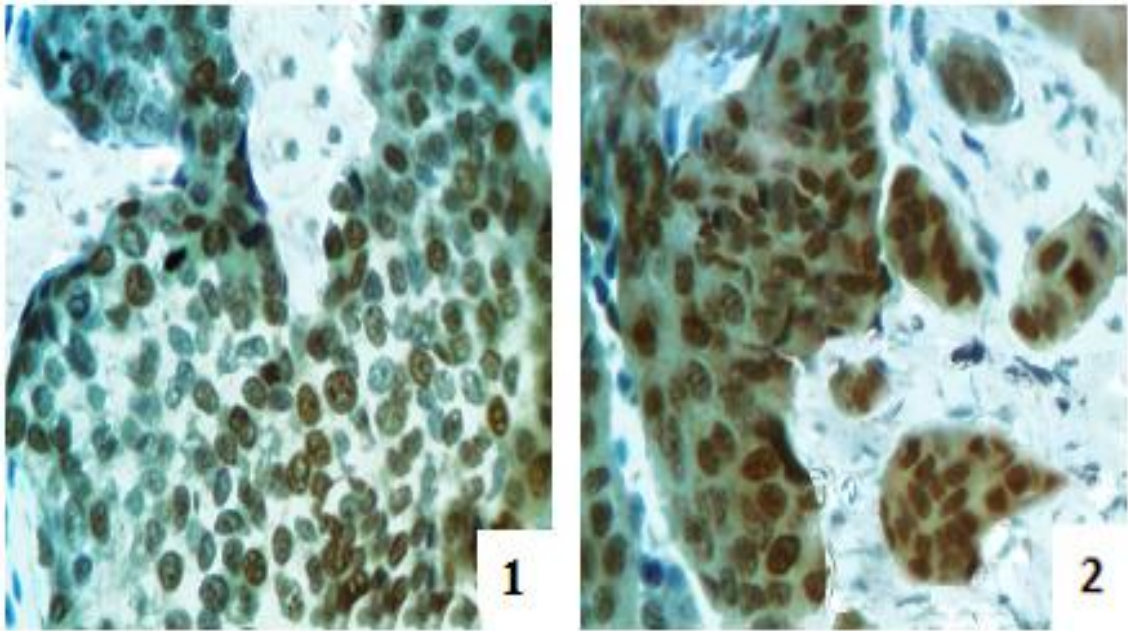


Рис. 3.25. Тканина ІПРМЗ низького ступеня диференціювання з першої групи жінок. 1 – тканина ІПРМЗ з ядерною локалізацією ензиму, 2 – комбінація ядерної і цитоплазматичної експресії MGMT в тканині ІПРМЗ.

ІГХ дослідження експресії MGMT. Збільшення  $\times 400$ .

Хоча при статистичній обробці результатів достовірної різниці по наявності експресії репаративного ензиму не виявлено ( $p=0,058$ ) між групами, має місце тенденція до більш вираженої реакції у першій групі, що вказує на взаємозв'язок між накопиченням ВМ та рівнем утворення MGMT. Окрім цього в дослідженні виявлено кореляційний зв'язок між накопиченням ВМ та рівнем експресії MGMT ( $r=0,33$ ).

При виявленні статистично достовірного кореляційного зв'язку між наявністю попередньо-вивчених всіх виявлених рецепторів, що впливають на проліферативну активність та апоптоз, та рівнем MGMT нами отримано негативний результат ( $p>0,05$ ). Це вказує на окремий вплив деметилювального ензиму на перебіг злякисного процесу, який не залежить від наявності порушень в інших ланках патогенезу. Але при дослідженні

комбінації експресії MGMT та ER виявлена цікава закономірність – при зростанні експресії репаративного ензиму зменшується частота виявлення та рівень експресії рецепторів до стероїдних гормонів ( $r=-0,5$ ). Цей помірний кореляційний зв'язок говорить про супресорний вплив або ж самого ензиму, або продуктів його реакції на наявність прогностично-сприятливих рецепторів естрогену в тканині ППМЗ.

В табл. 3.12 представлені зведені дані взаємозв'язку між експресією MGMT та всіма вищезазначеними рецепторами у тканині ППМЗ та мікроелементним складом пухлини.

Таблиця 3.12

Взаємозв'язок між показниками експресії рецепторів у тканині ППМЗ та хімічним складом пухлини, враховуючи коефіцієнт кореляції Пірсона ( $r$ )

	<b>BM</b>	<b>ER</b>	<b>PR</b>	<b>HER2</b>	<b>Ki-67</b>	<b>P53</b>	<b>bcl-2</b>
<b>MGMT</b>	<b>0,33</b>	<b>-0,5</b>	<b>-0,5</b>	<b>0,21</b>	<b>0,26</b>	<b>0,2</b>	<b>-0,1</b>

Показник (критичний) коефіцієнта кореляції Пірсона ( $r$ ) при рівні значимості  $p \leq 0,05$  для вибірки  $n=40$  дорівнює 0,31

Інвазивний потенціал пухлини нами вивчено за допомогою імуногістохімічного дослідження експресії білка MMP1, який має колагеназну активність. MMP1 експресія виявлялась в обох складових пухлинної тканини – у паренхімі та стромі (рис 3.26).

Патерном експресії виступала цитоплазма клітин, в яких знаходили різний ступінь інтенсивності реакції.

При ІГХ дослідженні були виявлені випадки, в яких зустрічалася більш виражена реакція як з боку стромального компонента, так і з боку паренхіматозної його складової. Позитивна реакція виявлена у всіх випадках ПМЗ, але вона була не однозначна у різних складових пухлини. Так позитивна реакція в ракових клітинах виявлена у 57,5% (23 випадки), 17

випадків (42,5%) були рецептор-негативними. З них 13 зразків (56,5%) знайдені в першій групі, а 10 (43,5%) – в другій.

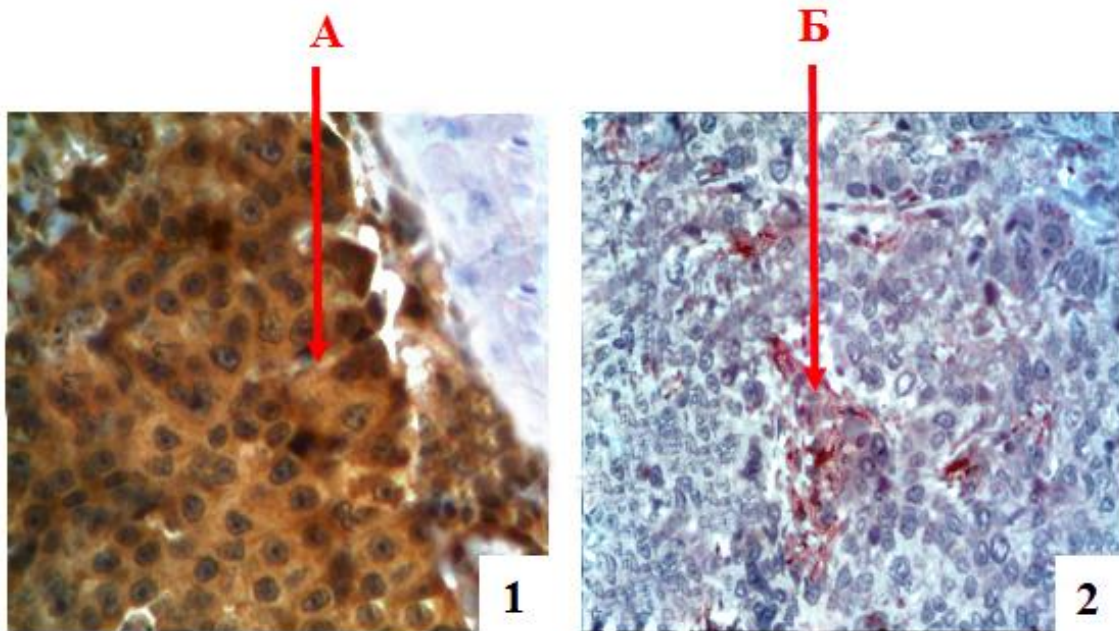


Рис. 3.26. Тканина ІПРМЗ низького ступеня диференціювання з першої групи жінок. 1 – паренхіматозна реакція, 2 – стромальна реакція.

А – клітини ІПРМЗ, Б – клітини строми.

ІГХ дослідження експресії MMP1. Збільшення  $\times 400$ .

В залежності від кількості позитивно-позабарвлених клітин результати розподілились наступним чином: перша група – 4 випадки з слабкопозитивною реакцією ( $0 < n < 30$ ), 6 зразків з помірнопозитивною реакцією ( $30 < n < 50$ ) та у 3 випадках реакція була сильнопозитивною ( $50 < n < 100$ ). У другій групі результати дослідження розподілилися наступним чином – 2 випадки були з слабкою реакцією, 6 з помірною та 2 із сильно вираженою реакцією. При дослідженні експресії MMP1 стромальним компонентом пухлини виявили позитивну реакцію у 31 випадку (78%). 9 зразків (22%) були рецептор-негативними. Розподіл на групи за рівнем експресії наведено у табл. 3.13.

Різниці між наявністю рецепторів MMP1 в обох групах не виявлено ( $p > 0,05$ ).

Таблиця 3.13

## Експресія рецепторів MMP1 стромальним компонентом пухлини

	Інтенсивність реакції			
	Негативна	Слабо позитивна	Помірно позитивна	Сильно позитивна
Перша група	5 (25%)	7 (35%)	7 (35%)	1 (5%)
Друга група	4 (20%)	7 (35%)	8 (40%)	1 (5%)

При статистичній обробці результатів встановлено кореляційний зв'язок між експресією MMP1 у паренхімі та стромі ( $r=0,47$ ). Також не знайдено кореляційної залежності між рівнем загальної кількості ВМ та інтенсивністю рецепторної реакції ( $r=0,09$  для паренхіми та  $r=-0,12$  для стромі). Але, аналізуючи рівень виявлення білка з показниками вмісту кожного з елементів, встановлено позитивний кореляційний зв'язок між кількістю Zn та ступенем експресії MMP1 ( $r=0,61$  для паренхіми та  $r=0,33$  для стромі). Це вказує на безпосередню участь Zn в наданні інвазивних властивостей тканині ППРМЗ. Простежувалась тенденція до виявлення метастатичних вогнищ і в лімфатичних вузлах зі зростанням ступеню експресії MMP1. Нами не відмічено статистичного достовірного кореляційного зв'язку експресії MMP1 з жодним з вищезазначених рецепторів, що вказує на незалежний механізм регулювання синтезу білка та його функціональну активність.

Що стосується особливостей експресії протеїназного ферменту раковими клітинами нами встановлена наступна закономірність – зростання внутрішньоклітинної кількості білка від центру до периферії солідного пухлинного утворення. Це говорить про безпосередню участь периферійно розташованих клітин у лізисі стромального матриксу і інвазивному поширенні неопластичної тканини.

У процесі контакту пухлини зі стромальним компонентом клітини, проявляючи колагеназну активність (за рахунок наявності MMP1),

розчиняють її. В результаті цього виникають пустоти (лакуни), в які і проникають ракові клітини (рис. 3.27).

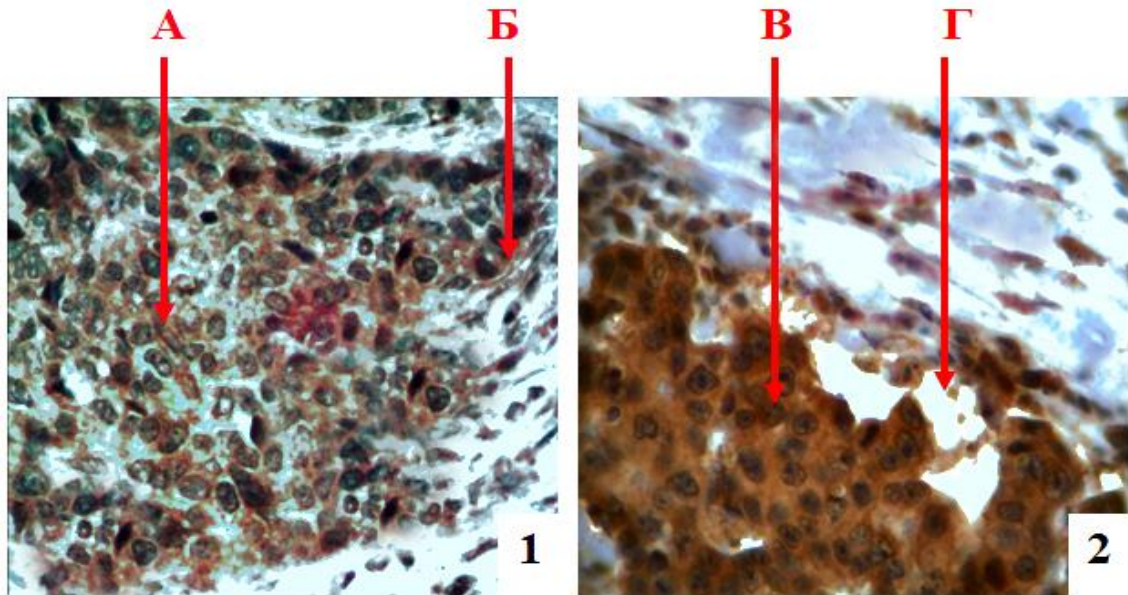


Рис. 3.27. Тканина ІПРМЗ низького ступеня диференціювання з першої групи жінок. 1 – гетерогенна реакція ракових клітин, 2 – процес резорбції стромы. А – центральні ракові клітини, Б – периферійні пухлинні клітини, В – клітини пухлини на межі зі стромою, Г – пустоти за типом лакун.

ІГХ дослідження експресії MMP1. Збільшення  $\times 400$ .

За рахунок такого ж механізму відбувається і проникнення неопластичних клітин у порожнину судини.

Що стосується експресії білків Е кадгерину, які мають функцію протилежну MMP1, то результати виявилися наступними: всі 100% пухлин були Е-кадгерин+, бо вони представлені ІПРМЗ, серед яких слабкопозитивна реакція виявлена у 15 випадках (37,5%), помірнопозитивна – також у 15 випадках (37,5%) та сильнопозитивна реакція знайдена у 10 зразках (25%) (рис.3.28).

Розподіл ІГХ реакції за групами наведено у табл. 3.14.

Статистично-достовірної різниці між наявністю рецепторів Е-кадгерину в обох групах дослідження не виявлено ( $p > 0,05$ ). Але, аналіз результатів показав наявність негативної кореляційної залежності між

експресією Е-кадгерину та хімічним складом тканини РМЗ ( $r=-0,32$ ), що говорить про інгібуючий вплив ВМ на адгезивні властивості клітин. Також мали місце негативні кореляційні зв'язки між експресією Е-кадгерину та MMP1 ( $r=-0,48$ ), наявністю метастазів та експресією білка адгезії ( $r=-0,49$ ).

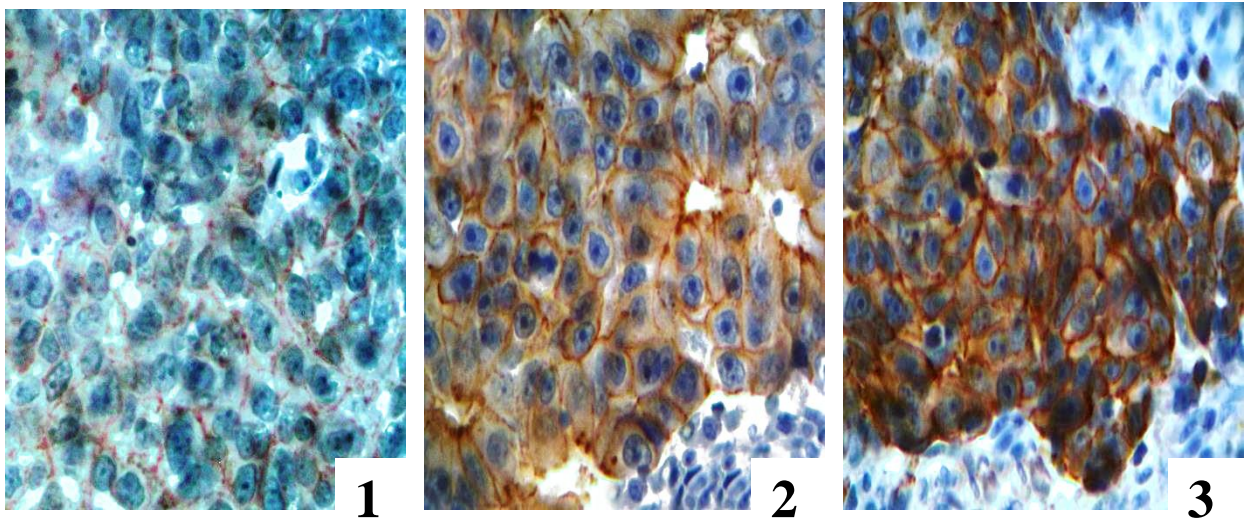


Рис. 3.28. Тканина ППРМЗ низького ступеня диференціювання.

1 –слабопозитивна, 2 – помірнопозитивна та 3 – сильнопозитивна мембранна реакція. ІГХ дослідження експресії Е-кадгерину. Збільшення  $\times 400$ .

Таблиця 3.14

ІГХ дослідження рецепторів Е-кадгерину у двох групах тканин

	Інтенсивність реакції		
	Слабо позитивна	Помірно позитивна	Сильно позитивна
Перша група	10 (50%)	8 (40%)	2 (10%)
Друга група	5 (25%)	11 (55%)	4 (20%)

Все вищезазначене підтверджує антогоністичну роль Е-кадгерину у процесі прогресування ППРМЗ по відношенню до інших прогностично-несприятливих факторів канцерогенезу.

Як і у випадку MMP1, ми не встановили статистично-достовірного зв'язку ( $p>0,05$ ) експресії Е-кадгерину з наявністю інших рецепторів (ER, PR, HER2/neu, p53, Ki-67 та bcl-2).

Дані, отримані при імуногістохімічному дослідженні рецепторів MMP1 та E-кадгерину, показують, що пухлинна тканина має різний потенціал до розповсюдження, який проявляється у наявності протеїназної активності та послабленні здатності до адгезії, які також залежать від хімічного складу неопластичної тканини. Наявність гетерогенної реакції стосовно рецепторів MGMT слугує індикатором різнопланової репаративної активності ракових клітин, від якої може залежати і стероїд-позитивний профіль пухлини.

Відсутність взаємозв'язків між наявністю цих рецепторів і іншими індикаторами проліферативної активності і апоптозу клітин демонструє незалежну функцію ракових клітин по відношенню до різних напрямків прогресування неопластичного процесу.

#### **3.4.4. Дослідження експресії VEGF та OPN.**

Однією з прогностично несприятливих особливостей неопластичного процесу є участь ракових клітин у процесі ангіогенезу в пухлинній тканині. З метою виявлення її прихованого ангіогенного потенціалу нами було досліджено 30 випадків ППРМЗ, які включали як зразки із першої групи (16), так і випадки із групи жінок, які мешкали в «екологічно-чистих» районах Сумської області (14). В дослідженій вибірці враховувались всі критерії (гістологічні та імуногістохімічні), але акцент був спрямований на дослідження васкуляризації пухлинної тканини, тому як VEGF є прямим його індикатором. У залежності від цього випадки були розподілені на 3 групи: 0 балів – відсутні судинні утворення в гістологічному зрізі препарату, 1 бал – зустрічаються поодинокі ангіогенні утворення, 2 бали – площа, яку займають судини більше 1% площі препарату.

При гістологічному дослідженні препаратів, забарвлених гематоксилін-еозином, встановлено відсутність судин у 11 випадках (37%), поодинокорозташовані судини у 13 зразках (43%) та у 6 випадках (20%) судини займали більше 1% площі препарату.

При імуногістохімічному дослідженні встановлено, що патерном експресії рецепторів VEGF виступають цитоплазма та клітинна мембрана онкоцитів і складові міжклітинного матриксу. ДАБ-позитивний компонент клітини (досліджений білок) виявлявся у вигляді внутрішньоклітинних скупчень. У результаті оцінювання реакції всі випадки розподілені 4 групи: негативна, слабо-, помірно- та сильнопозитивна реакції (рис. 3.29).

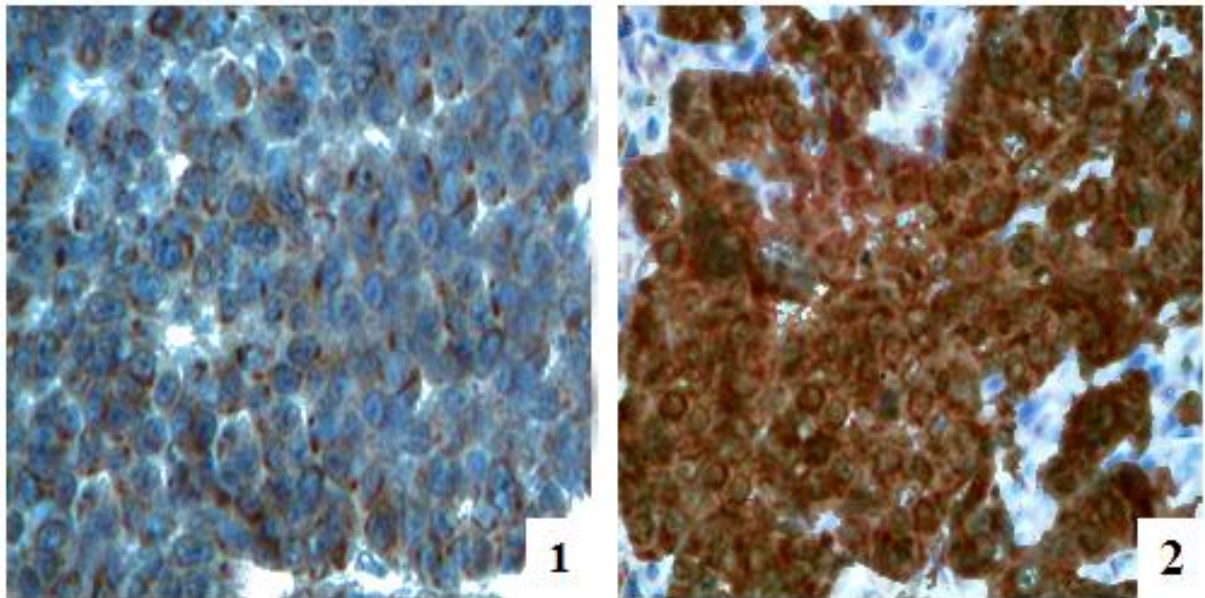


Рис. 3.29. Тканина ІПРМЗ низького ступеня диференціювання.

1 – слабопозитивна мембранна реакція, 2 – сильнопозитивна мембранно-цитоплазматична реакція.

ІГХ дослідження рецепторів VEGF. Збільшення  $\times 400$ .

Дані ІГХ дослідження відображені в табл. 3.15.

Таблиця 3.15

Експресія рецепторів VEGF тканиною ІПРМЗ

	Інтенсивність реакції			
	Негативна	Слабка	Помірна	Сильна
Кількість	9	9	10	2
Відсоткове співвідношення	30%	30%	33%	7%

Як видно з таблиці 3.15 у 70% випадків мала місце позитивна реакція щодо наявності VEGF рецепторів, у 30% вони були VEGF-негативними. При ІГХ дослідженні встановлено, що більш інтенсивне забарвлення мають ракові клітини навколо судинних утворень, що говорить про їх безпосередню участь у ангіогенезі. На препаратах виявлена, також, позитивна реакція як з боку стромального компонента пухлини, так і з боку ендотелію судин (рис. 3.30), що вказує на їх участь у пухлинному ангіогенезі.

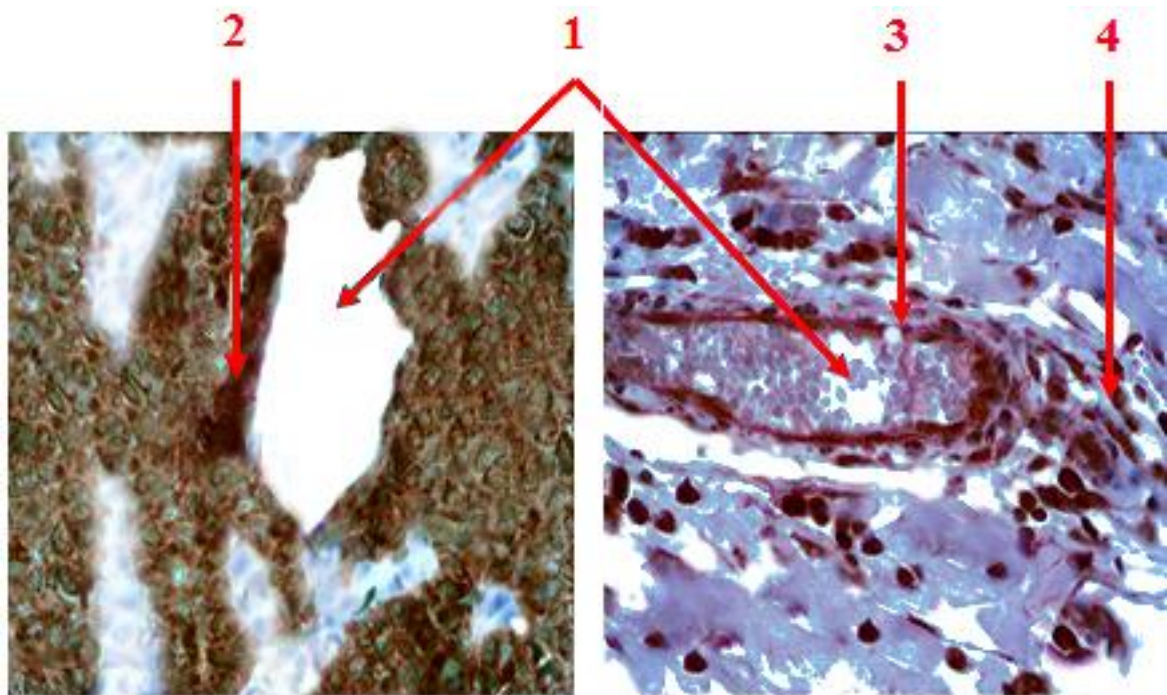


Рис. 3.30. Тканина ІПРМЗ помірного ступеня диференціювання.

1 – просвіт судини, 2 – периваскулярні ракові клітини, 3 – ендотелій, 4 – стромальний компонент.

ІГХ дослідження рецепторів VEGF. Збільшення  $\times 400$ .

При статистичній обробці результатів встановлено наступні закономірності. При зростанні васкуляризації неопластичної тканини збільшується рівень експресії рецепторів VEGF ( $r=0,67$ ), що показує на безпосередню участь білка в судинному новоутворенні. Виявлено тенденцію до появи віддалених метастазів за умови зростання експресії рецепторів VEGF та присутністю судин у гістологічних зрізах. Наявність позитивного кореляційного зв'язку між показниками ангіогенезу ( $r=0,46$  та  $r=0,42$

відповідно) та ступенем диференціювання ІПРМЗ говорить про посилення кровопостачання неопластичної тканини при зниженні диференціювання РМЗ.

Проведене дослідження взаємозв'язку між рівнем накопичення ВМ у пухлинній тканині, що встановлено в попередньо-проведених дослідженнях по вивченню хімічного складу тканини, і рівнем експресії рецепторів VEGF показує на слабкий позитивний кореляційний зв'язок між двома показниками ( $r=0,33$ ). Але при вивченні цих же особливостей з кожним з досліджуваних МЕ встановлено помірний позитивний кореляційний зв'язок ( $r=0,59$ ) між наявністю ангіогенного фактору та вмісту Cu, що вказує на участь саме міді в васкуляризації тканини ІПРМЗ.

При порівнянні даних ІГХ дослідження по виявленню судинних рецепторів з іншими маркерами РМЗ встановлено наявність слабого зв'язку з рівнем стероїдних ( $r=-0,38$ ) та HER2/neu ( $r=0,36$ ) рецепторів, відсутність будь-яких поєднань з наявністю рецепторів до Ki-67, p53 та bcl-2 ( $r=0,15$ ,  $r=0,16$  та  $r=-0,17$  відповідно).

Вплив OPN на процес біомінералізації вивчали також на 30 зразках пухлинної тканини з обох груп дослідження, які включали 20 випадків, де при гістологічному забарвленні гематоксилін-еозином та алізариним червоним S виявлено відкладання солей кальцію та 10 зразків, у яких були відсутні вогнища патологічної мінералізації. Патерном експресії слугувала цитоплазма ракових клітин.

У загальну вибірку дослідження увійшли випадки з обох («екологічно-чистих» та «екологічно-забруднених») груп дослідження. В процесі ІГХ дослідження встановлено негативну реакцію у всіх випадках тканини ІПРМЗ без мінералізації, та у 20% (4 випадки) петрифікованої тканини. 16 зразків з наявністю вогнищ патологічної мінералізації були OPN-позитивними. Результат позитивної реакції встановлювали за інтенсивністю забарвлення ракових клітин та їх кількості. Ми отримали у 8 випадках (50%) слабкопозитивну, у 6 зразках (38%) – помірнопозитивну та у 2 випадках (12%)

– сильнопозитивну реакцію. Як у випадку негативної ІГХ реакції, так і при наявності реакції щодо експресії OPN біомінералізати забарвлювалися в коричневий колір, що пов'язано з неспецифічним зв'язуванням ДАБу з структурою мінерального компонента (рис. 3.31).

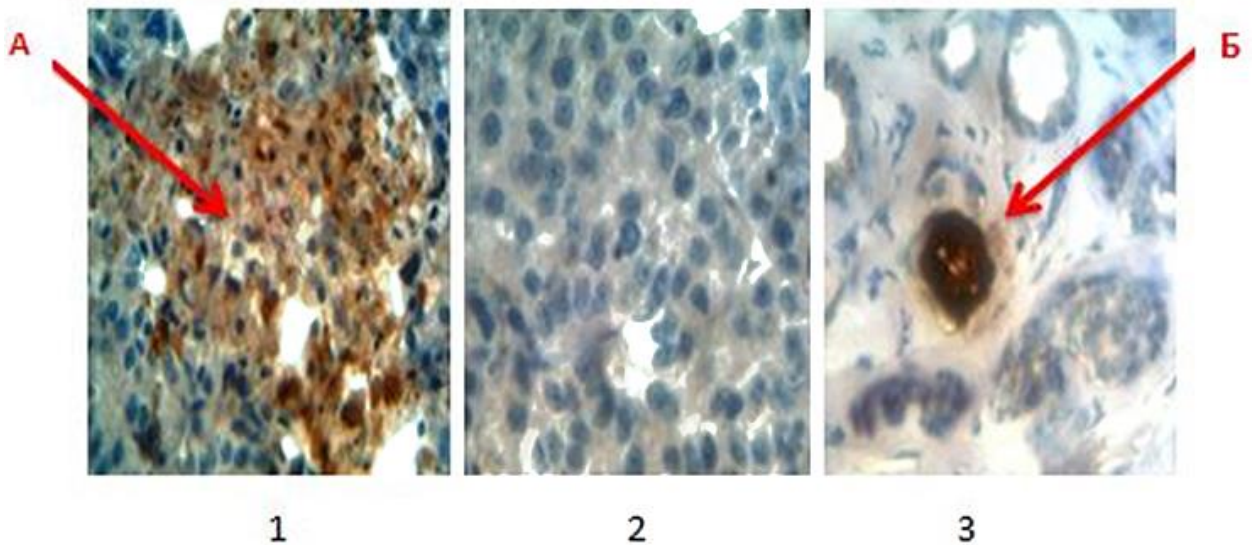


Рис. 3.31. Тканина ІПРМЗ різного ступеня диференціювання.

1 – позитивна цитоплазматична реакція (А – позитивно забарвлені клітини),  
2 – негативна реакція, 3 – негативна реакція з присутнім мінералізатом (Б – мінералізат).

ІГХ дослідження рецепторів OPN. Збільшення  $\times 400$ .

Виявлено позитивний кореляційний зв'язок між ступенями експресії OPN та диференціюванням ІПРМЗ ( $r=0,5$ ), що вказую на набуття функції мінералоутворення з прогресуванням неопластичного процесу. Виявлено тенденцію до поєднання наявності внутрішньоклітинного OPN та зниження експресії раковими клітинами прогностично-сприятливих рецепторів до стероїдних гормонів.

Взаємозв'язку між наявністю прогностично-несприятливих bcl-2, HER2/neu, Ki-67, p53 рецепторів та OPN не встановлено ( $r=-0,2$ ,  $r=0,13$ ,  $r=0,14$ ,  $r=0,25$  та  $r=-0,2$  відповідно).

Статистично-достовірної різниці в експресії OPN між двома групами дослідження (у тканині жінок з «екологічно-чистих» та «екологічно-забруднених» районів) не виявлено ( $p > 0,05$ ). Але, порівнюючи дані атомної спектрофотометрії з результатами ІГХ дослідження, помітна тенденція до зростання експресії фактору мінералізації пухлинної тканини зі зростанням ВМ в складі неоплазії, що в більшій мірі пов'язано з накопиченням раковими клітинами іонів Fe ( $r = 0,43$ ).

Отже, неопластична тканина в процесі прогресування набуває нових якостей, таких як васкуляризація та патологічна петрифікація, які мають ендогенне підґрунтя. Ракові клітини, експресуючи фактори васкулогенезу та мінералізації, призводять до розростання судин та відкладання солей кальцію у неопластичній тканині, які виступають факторами прогресування перебігу ІПРМЗ.

Наявність кореляційних зв'язків між цими показниками і елементним складом пухлинної тканини вказує на участь останніх (Cu, Fe) у набутті неоплазії нових якостей і поширенні її по організму.

#### **3.4.5. Вивчення експресії білка hsp90 $\alpha$ .**

Вивчення експресії білків теплового шоку проводилося також на двох групах тканин ІПРМЗ. Враховуючи основну функцію протеїну, яка полягає в адаптивній відповіді на стресові фактори, що виникають у процесі запалення та накопиченні ВМ, для дослідження взято 24 випадки з запальною інфільтрацією в стромі та 19 – без виявлення імунної відповіді в пухлинному мікрооточенні.

У результаті проведеного імуногістохімічного дослідження було виявлено, що вміст hsp90 $\alpha$  в пухлинних клітинах характеризується цитоплазматичною та ядерною локалізацією у різних співвідношеннях. Результати виявилися наступними: майже 80% (34 зразки) пухлин МЗ були позитивними щодо експресії hsp90 $\alpha$ , що вказує на участь цього білка в пухлинному розвитку. Майже у 20% (9 зразків) випадків реакція на наявність

білка теплового шоку не спостерігалась. Розподіл реакції по групах наведено у табл. 3.16, яка включає у випадку позитивної реакції поділ останніх на 3 підгрупи: слабопозитивна (1 бал), помірнопозитивна (2 бали) та сильнопозитивна (3 бали) реакція, враховуючи кількість клітин та інтенсивність їх забарвлення.

Таблиця 3.16

Експресія рецепторів hsp90 $\alpha$  тканиною ІПРМЗ

	Тканина з запальною інфільтрацією	Тканина без запальної інфільтрації
Негативна реакція	2	7
Слабопозитивна реакція	2	7
Помірнопозитивна реакція	11	3
Сильнопозитивна реакція	9	2

Як видно з табл. 3.16 в першій групі позитивна реакція спостерігалась у 92% випадків і в більшості випадків була або помірно, або сильно позитивною. В той час як у другій групі її виявляли тільки у 63% зразків, де рівень її експресії у більшості випадків був оцінений як слабо або помірнопозитивний.

Клітини першої групи тканин у більшості випадків мали більш виразне забарвлення в порівнянні з раковими клітинами другої групи (рис. 3.32).

У пухлинній тканині жінок, що мешкають в «екологічно-забруднених» районах, мав місце вищий ступінь експресії шаперону ( $p < 0,05$ ) за той, що виявлено у тканині жінок з «екологічно-чистих» районів області.

У результаті статистичної обробки результатів встановлено, що рівень експресії hsp90 $\alpha$  в першій групі був вищий за той, що спостерігався у групі без наявності стромальної імунної відповіді ( $p < 0,05$ ). Виявлено помірний позитивний кореляційний зв'язок між ступенем експресії шаперону та наявністю імунцитів у пухлинному мікрооточенні ( $r = 0,52$ ). HER2/neu-позитивні пухлини в 100% випадків супроводжувалися наявністю hsp90 $\alpha$ , що

вказує на його участь у прогресуванні ПРМЗ. Встановлено негативний кореляційний зв'язок між експресією рецепторів до стероїдних гормонів та білків теплового шоку ( $r=-0,43$ ), яке підтверджує участь останніх у блокуючій дії на гормональний фенотип ракових клітин.

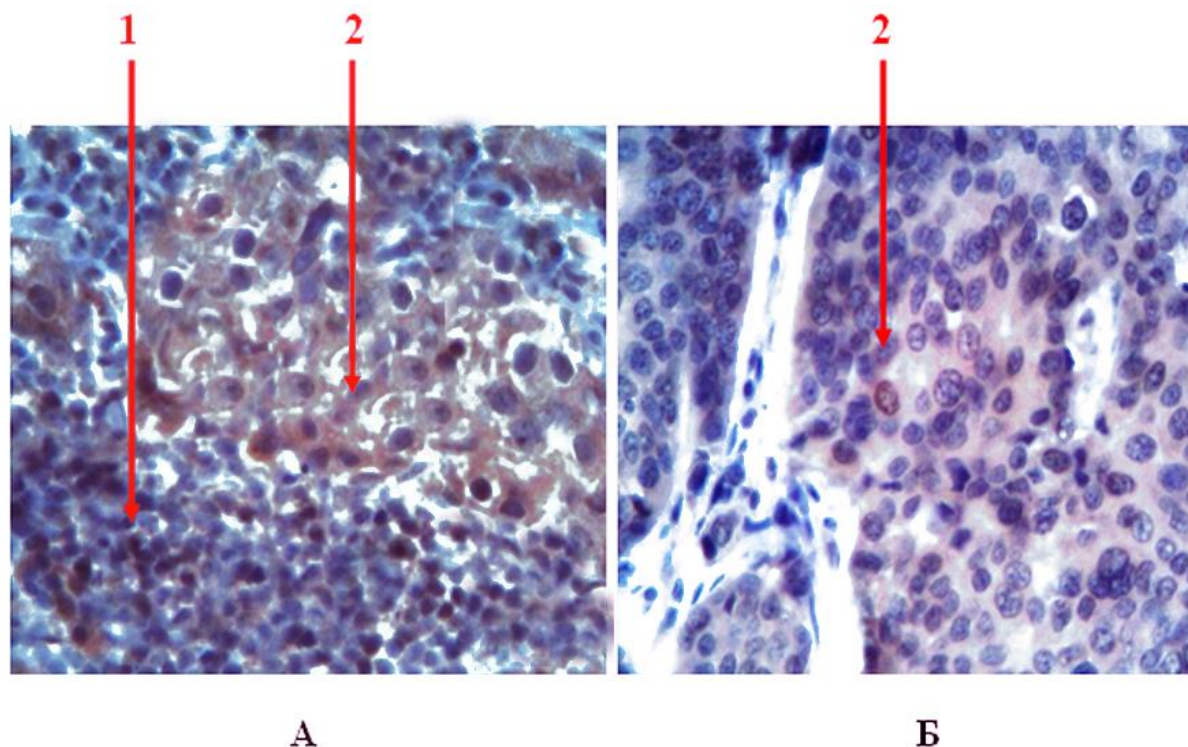


Рис. 3.32. Тканина ПРМЗ з різною стромальною реакцією.

А – пухлинна тканина з запальною реакцією в стромі, Б – пухлинна тканина без запальної реакції в стромі. 1 – клітини інфільтрату, 2 – пухлинні клітини.

Імуногістохімічна реакція по визначенню hsp90 $\alpha$ . Збільшення  $\times 400$ .

Кореляційний аналіз між накопиченням ВМ в тканині ПРМЗ та наявністю шаперону виявив тенденцію до зростання шаперонової відповіді на екзогенне потрапляння ВМ до пухлинної тканини. Будь-якого взаємозв'язку між експресією Ki-67 ( $r=0,07$ ), p53 ( $r=-0,1$ ), bcl-2 ( $r=-0,05$ ) та ступенем вираженості шаперонової реакції не встановлено, що вказує на незалежну від проліферативно-апоптичного профілю функцію hsp90 $\alpha$ .

Отже, пухлинні клітини мають різний ступінь шаперонового захисту у процесі прогресуванні неоплазії, від якого залежить не тільки стійкість ПРМЗ перед агресивними факторами захисту макроорганізму, а й

рецепторний фенотип ракових клітин. Більш вищі показники експресії hsp90α у пухлинній тканині жінок, які мешкають у «екологічно-забруднених» районах області, вказують на реакцію ракових клітин на підвищене екзогенне надходження ВМ до тканини МЗ синтезом факторів захисту, тим самим стимулюючи стійкість ІПРМЗ. Наявність 100% поєднань експресії hsp90α та HER2/neu презентує тісну взаємодію функціонування рецепторів фактору росту та їх конформаційним дозріванням, у процесі якого ключову роль відіграє саме шаперон 90.

#### **3.4.6. Дослідження якісного складу запального пухлинного імунного мікрооточення.**

Враховуючи відсутність можливості ідентифікації різних форм лейкоцитів за допомогою гістологічного дослідження нами проведено ІГХ дослідження з використанням специфічних маркерів для В-лімфоцитів, Т-лімфоцитів, гранулоцитарних лейкоцитів та макрофагів. Дослідження проведено на 24 зразках ІПРМЗ з обох груп дослідження, в яких при забарвленні препаратів гематоксилін-еозинов виявлена запальна реакція між раковими клітинами.

За допомогою антитіл до рецепторів CD79α були ідентифіковані В-лімфоцити. Патерном експресії виступали клітинна мембрана, яка при забарвленні ДАБом окреслювала контури клітин інфільтрату. ІГХ дослідження показало, що В-лімфоцити розташовувались у клітинному імунному мікрооточенні як дифузно-розкидано, так і у вигляді скупчень. Останній варіант частіше спостерігався при нодулярному варіанті, який утворювали імуноцити. За рахунок підрахунку кількості CD79α-позитивних В-лімфоцитів в 10 полях зору препарату при збільшенні мікроскопу ×400 встановлено, що вони складають від 20% до 60% від загальної кількості лейкоцитів (рис. 3.33).

Згідно наших результатів у 42% (10 випадків) кількість В-лімфоцитів складала від 20% до 40%, у 58% (14 випадків) – від 40% до 60%.

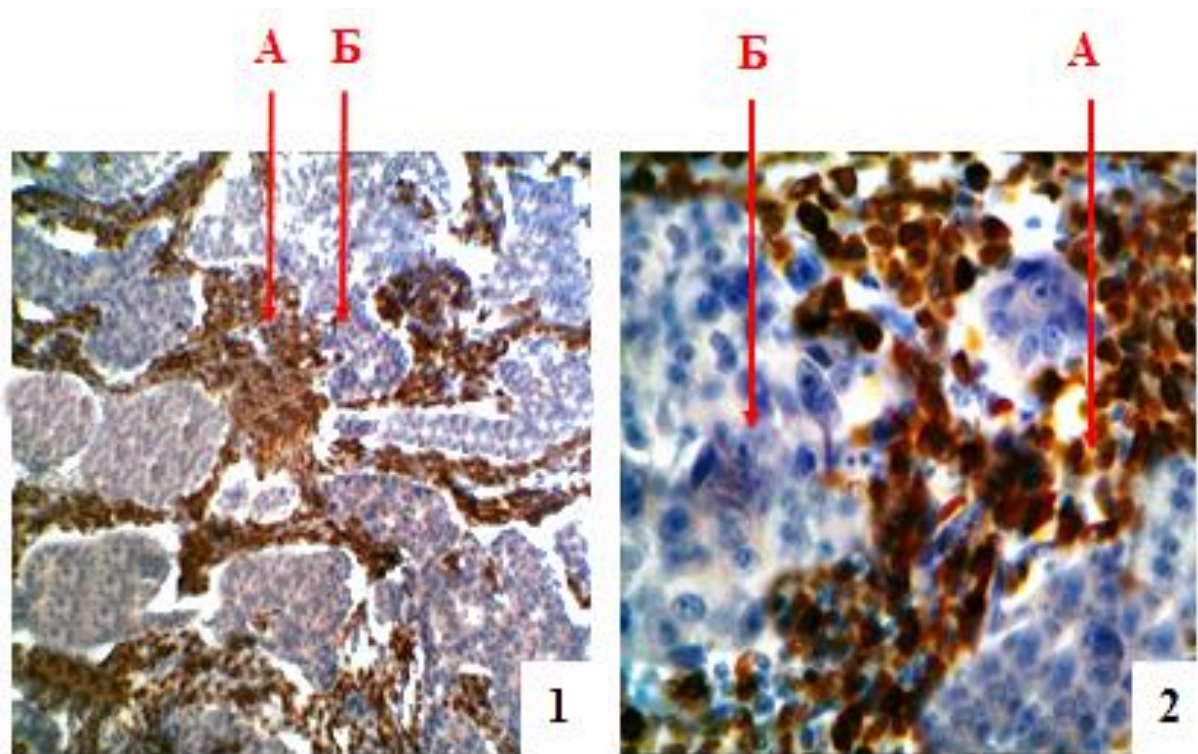


Рис. 3.33. Тканина ІПРМЗ низького ступеня диференціювання з запальною реакцією в стромі. А – CD79 $\alpha$ + В-лімфоцитарна інфільтрація, Б – пухлинна тканина. ІГХ дослідження рецепторів CD79 $\alpha$ . 1 – збільшення  $\times 100$ , 2 –  $\times 400$ .

При вивченні наявності Т-лімфоцитів у складі інфільтрату тієї ж кількості зразків ІПРМЗ за допомогою ІГХ дослідження з використанням антитіл до CD3 рецепторів виявлено, що патерном експресії виступає мембрана лімфоцитів, яка, як і у випадку дослідження CD79 $\alpha$  рецепторів, забарвлюється ДАБом, окреслюючи контури клітин. Розташовуються вони дифузно, без формувань будь-яких утворень. При підрахунку їх кількості виявлено, що Т-лімфоцити складають від 25% до 70% від загальної кількості лейкоцитів (рис. 3.34).

У 14 випадках (52%) кількість CD3-позитивних клітин була на рівні 25%-50%, у 10 випадках (48%) – на рівні 50%-70%.

Взагалі на долю лімфоцитів (В та Т) припадає до 85-90% від всіх представлених форм лейкоцитів. Виявлено негативний сильний кореляційний зв'язок ( $r=-0,97$ ) між наявністю Т та В лімфоцитів у пухлинному мікрооточенні.

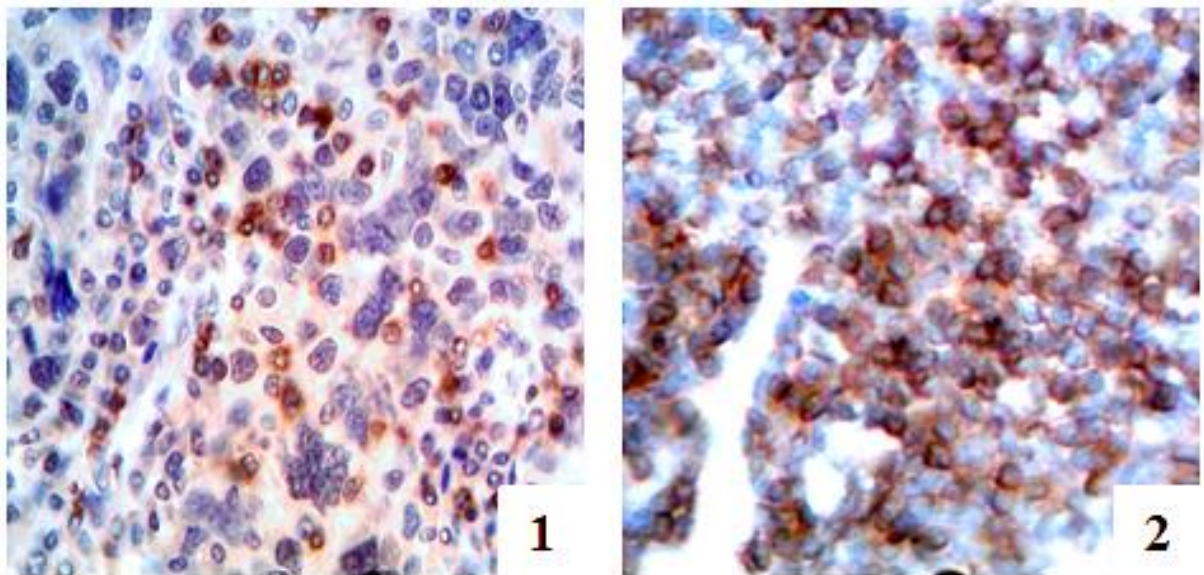


Рис. 3.34. Імунний інфільтрат в стромі ППРМЗ.

1 – кількість В-лімфоцитів  $\approx 25\%$ , 2 – кількість В-лімфоцитів  $\approx 70\%$

ІГХ дослідження рецепторів CD3. Збільшення  $\times 400$ .

Використовуючи МРО антитіло, нами ідентифіковані гранулоцитарні форми лейкоцитів – нейтрофіли та еозинофіли. ІГХ реакція показала, що патерном експресії МРО виступає цитоплазма (рис. 3.35).

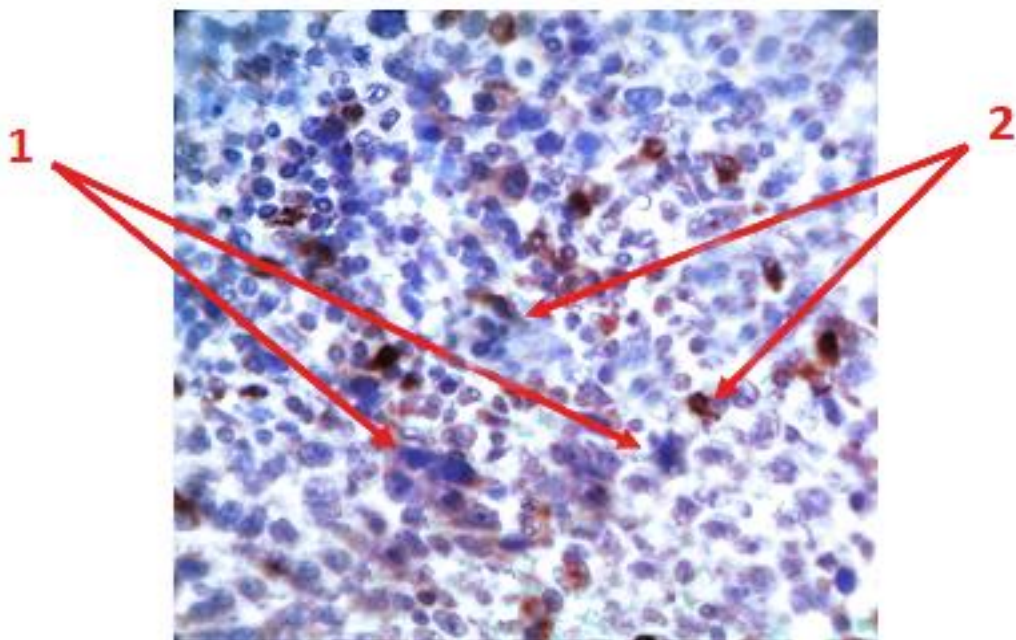


Рис. 3.35. Імунний інфільтрат в тканині ППРМЗ.

1 – пухлинні клітини, 2 – МРО-позитивні гранулоцити.

ІГХ дослідження рецепторів МРО. Збільшення  $\times 400$ .

Завдяки виявленню рецепторів MPO ми відокремлювали гранулоцити від інших форм лейкоцитів, тому що ні лімфоцити, ні плазматичні клітини, ні макрофаги не експресують рецепторів MPO.

MPO-позитивні клітини серед загальної кількості лейкоцитів склали від 1% до 7%. Взаємозв'язку між кількістю гранулоцитів та будь-якою формою лімфоцитів не виявлено ( $p > 0,05$ ). Це вказує на незалежну від Т та В лімфоцитів функцію гранулоцитів у вогнищі клітинної інфільтрації навколо пухлинного ураження тканини МЗ.

При проведенні ІГХ дослідження з метою виявлення макрофагів нами використано антитіло до білка S100. Патерном експресії виступала цитоплазма (рис. 3.36).

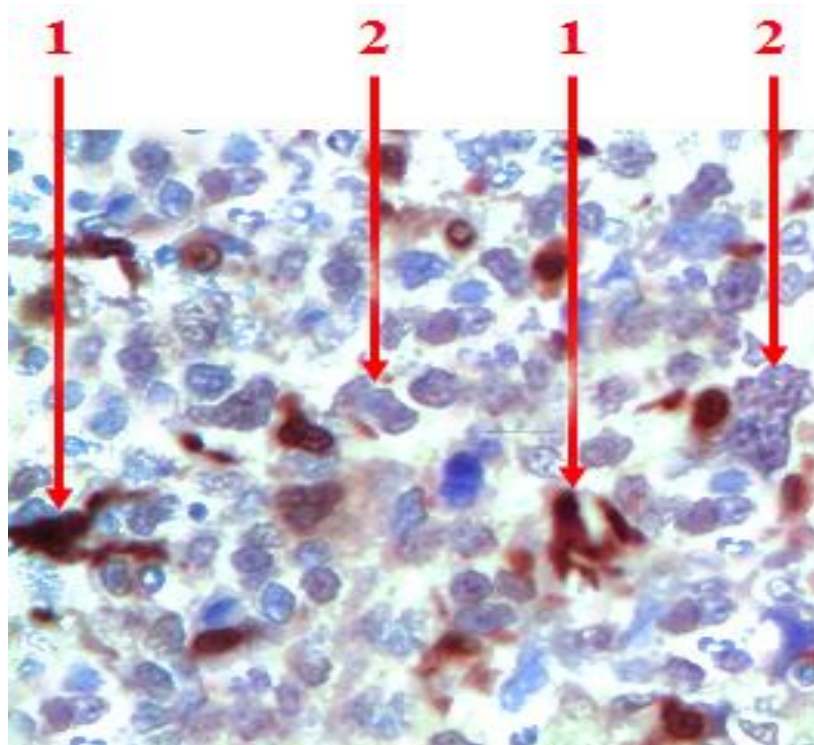


Рис. 3.36. Тканина ІПРМЗ з запальною інфільтрацією в стромі.

1 – S100-позитивні макрофаги, 2 – ракові клітини.

ІГХ дослідження рецепторів S100. Збільшення  $\times 400$ .

У S100-позитивних клітинах виявлено різну форму та розміри. Часто макрофаги утворювали відростки, які іноді огортали пухлинні клітини. Вони розташовувались розрізнено як серед імунного пухлинного інфільтрату, так і

серед ракових клітин. При формуванні імунними клітинами псевдофолікулів макрофаги розташовувались у центрі, а їх кількість зростала при появі просвітлень у центрі цих псевдофолікулів. Загальна кількість їх не перевищувала 15% від всіх форм лейкоцитів. При аналізі результатів виявлено кореляційний зв'язок між зростанням кількості В-лімфоцитів та макрофагів ( $r=0,66$ ), що вказує на взаємозв'язок між участю цих клітин в імунній відповіді на чужорідну пухлинну тканину.

Як показують результати попередньо-проведеного ІГХ дослідження, експресія прогностично-важливих рецепторів раковими клітинами залежить від якісного складу імунного інфільтрату (рис. 3.37).

В результаті проведеного дослідження встановлено цікаву закономірність, що при зростанні кількості В-лімфоцитів серед всіх форм лейкоцитів зменшується рівень експресії стероїдних рецепторів ( $r=-0,49$ ), що вказує на інгібуючий вплив імунної гуморальної відповіді на експресію прогностично-сприятливих рецепторів тканиною ППМЗ.

Так, естроген-позитивний профіль тканини РМЗ характеризувався співвідношенням В-лімфоцити:Т-лімфоцити:гранулоцитарні форми лейкоцитів:антиген-презентуючі макрофаги (1:2:3:4), яке дорівнює 2:7:0,5:0,5, у той час як для стероїд-негативного профілю неоплазії було характерно інше співвідношення, яке дорівнює 6:2,5:0,5:1 (1:2:3:4 відповідно). Оцінюючи вищезазначене, ми можемо констатувати, що, залежно від якісного складу імунного мікросередовища спостерігається різний ступінь експресії прогностичних маркерів в клітинах РМЗ. Наявність же самої запальної інфільтрації, як показують результати гістологічного дослідження та хімічного аналізу, зростає у міру анаплазії ракових клітин та накопичення ВМ у неопластичній тканині.

Отже, якісні характеристики ракової тканини залежать не тільки від самого факту наявності запалення навколо пухлинних клітин, а в більшій мірі від якісного складу імунного інфільтрату.

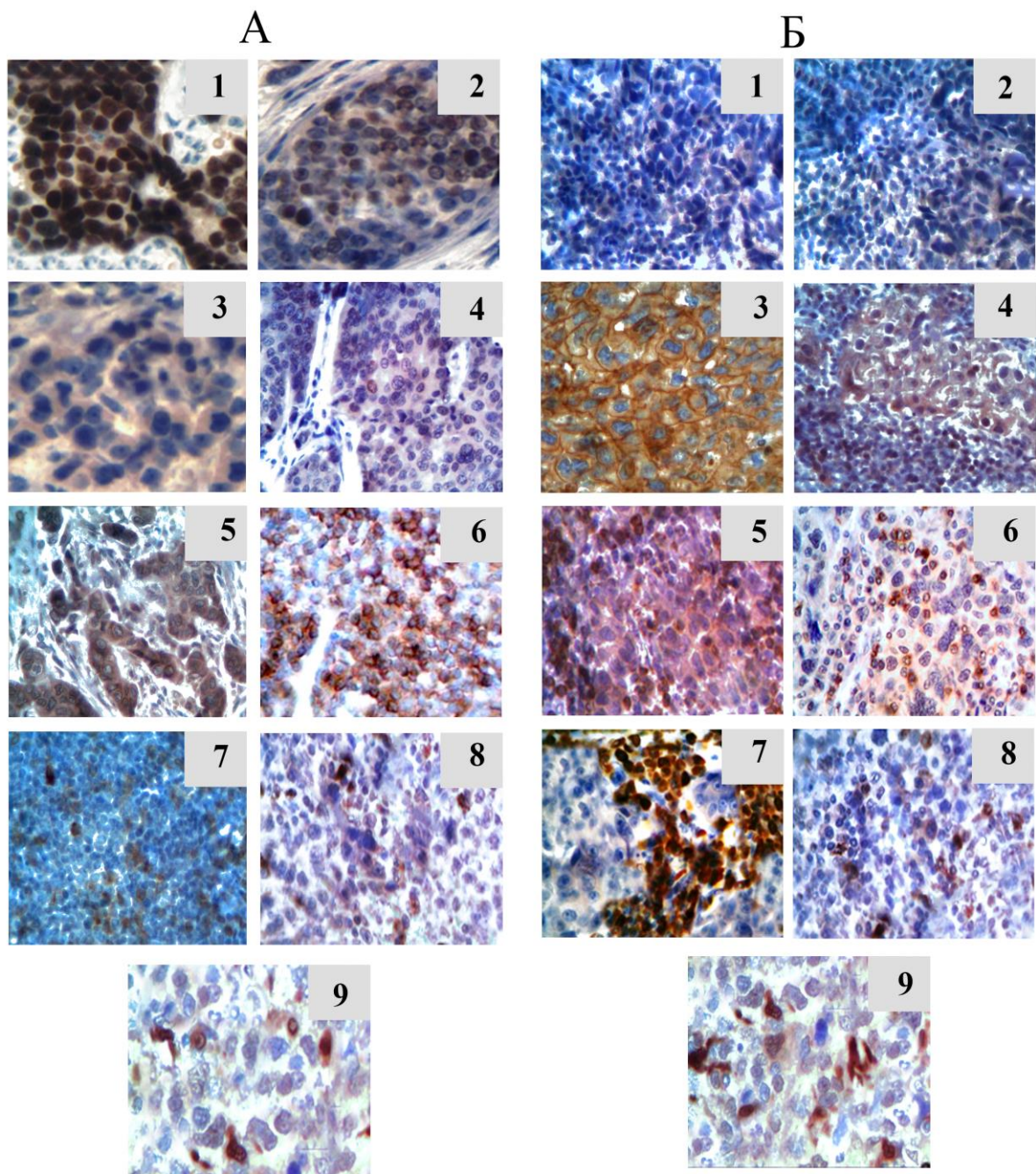


Рис. 3.37. Рецепторний фенотип стероїд-позитивної HER2/neu- (А) та стероїд-негативної HER2/neu+ (Б) тканини ІПРМЗ.

1 – ER $\alpha$ , 2 – PR, 3 – HER2/neu, 4 – hsp90 $\alpha$ , 5 – bcl-2, 6 – CD3, 7 – CD79 $\alpha$ , 8 – MPO, 9 – S100.

Аналізуючи результати ІГХ дослідження всіх рецепторів у тканині ІПРМЗ та порівнюючи з результатами гістологічного дослідження і вмістом хімічних елементів у неопластичній тканині, можна зробити заключення, що зростання кількості ВМ у пухлинній тканині призводить до інгібуючого

впливу на прогностично-сприятливі рецептори та активуючого впливу на прогностично-несприятливі рецептори у тканині ІПРМЗ. Це відбувається або за умови прямого впливу на рецептори, або через зміну якісних характеристик неопластичного процесу.

### **3.5. Дослідження змін ДНК у пухлинних клітинах.**

#### **3.5.1. Визначення фрагментації ДНК.**

ДНК, яке виділено протеазним методом, після зберігання в холодильній камері змішувалось з акридиновим-помаранчевим та укладалось у лунки 1% агарозного гелю. Під дією струму, який подавався на електрофоретичний буфер, відбувалося переміщення субстрату в бік аноду, тому як ДНК має негативний заряд.

Для дослідженні використано ДНК з 30 зразків досліджуваної тканини – 20 випадків ІПРМЗ різного ступеню злжкисності за Scarff-Bloom-Richardson (по 10 з кожної групи дослідження), 5 випадків віддалених метастазів і 5 випадків нормальної тканини МЗ. Оцінку результатів проводили через 30, 60, та 120 хвилин.

Як видно з рис. 3.38 вже через 30хв від початку електрофорезу починається розходження ДНК в бік аноду, але інтенсивність його різна. У всіх випадках попереду відбувалося переміщення ДНК фага  $\lambda$  у вигляді окремого нерозрізненого скупчення ультрафіолет-позитивного шару. Це не є випадковістю, враховуючи однорідність розмірів останніх ( $\sim 49000$ пн) та відсутність її фрагментації. Більш чітка картина вимальовується до 60хв та 120хв. Як бачимо з результатів при дослідженні виявлено декілька варіантів розподілу ДНК вздовж треку:

1. Вся досліджувана ДНК розташовується біля стартової лінії (трек 1,4), що вказує на відсутність фрагментації ДНК на більш менші частини. Ця картина характерна для інтактної тканини МЗ;

2. Більша частина ДНК знаходиться біля стартової лінії, але наявні і менші за розміром ДНК-фрагменти (трек 11);

3. Розподіл ДНК відбувся на дві групи майже порівну – одна частина біля стартової лінії, друга в дистальній частині треку (трек 6,7);

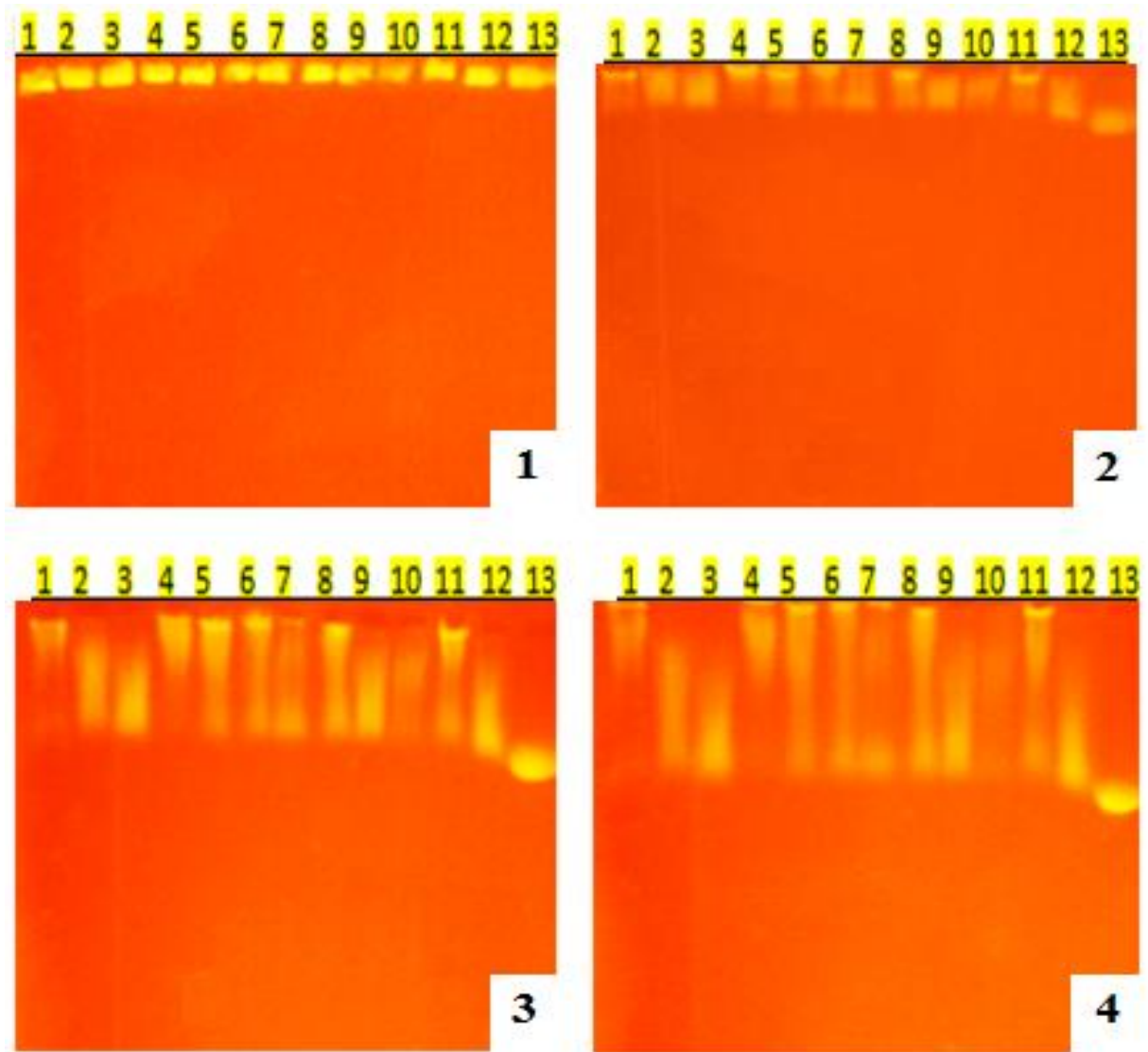


Рис. 3.38. ДНК-електофорез в агарозному гелі.

1 – початок електрофорезу, 2 – результат через 30хв, 3 – через 60хв, 4 – через 120хв. Трек 1,4 – інтактна тканина МЗ, трек 2,5,6,7,8,10,11,12, – тканина ІПРМЗ, трек 3,9 – тканина метастатичних вогнищ ураження, 13 – ДНК фага  $\lambda$ .

4. На трековій ділянці представлені ДНК фрагменти вздовж всієї полоси (трек 5,8,10);

5. Майже вся кількість ДНК розташовується в дистальній частині треку (трек 2,3,8,9,12), що вказує на майже тотальний рівень фрагментації ДНК.

За наявності незначного варіанту фрагментації ДНК її рівень оцінювали в 1 бал (2-ий варіант), при половинній фрагментації (3-ій варіант) – у 2 бали, при розташуванні ДНК вздовж треку (4-ий варіант) – у 3 бали та майже повному рівні фрагментації ДНК (5-ий варіант) – 4 бали.

Порівнюючи дані фрагментації ДНК з ДНК фага  $\lambda$ , можна зробити висновок, що в пухлинній тканині (трек 2,3,5-12) в процесі канцерогенезу відбуваються порушення регуляторних систем процесу поділу та репарації, в результаті чого відбувається виникнення розривів в ДНК, які стимулюють подальше прогресування неоплазії.

Встановлено, що пухлинна тканина з першої групи дослідження, у якої підвищена кількість ВМ, має більший ступінь фрагментації ДНК.

Цікаві результати отримано при порівнянні рівня фрагментації ДНК у первинному вогнищі (трек 2,8) з даними електрофорезу ДНК пухлинної тканини у віддалених метастазах (трек 3,9). Як бачимо в метастатичних вогнищах процес фрагментації прогресує, призводячи до утворення все більш дрібних фрагментів.

В табл. 3.17 наведені дані взаємозв'язку між рівнем фрагментації ДНК та експресією прогностично важливих рецепторів тканиною ІПРМЗ і її хімічним складом.

Як можна бачити з табличних даних має місце позитивний кореляційний зв'язок між рівнем фрагментації ДНК та накопиченням в тканині ІПРМЗ ВМ. Одночасно з підвищенням рівня фрагментації ДНК знижується чутливість тканини до антигормональних препаратів, про що говорить негативний зв'язок ( $r=-0,53$ ) між фрагментацією ДНК та наявністю ER.

Таблиця 3.17

Зв'язок між фрагментацією ДНК та даними ІГХ дослідження тканини ІПРМЗ та її елементним складом, враховуючи коефіцієнт кореляції

Пірсона (r)

	ME	ER	PR	HER2/neu	Ki-67	p53	bcl-2	MGMT
Фрагментація ДНК	0,49	-0,53	-0,4	-0,06	0,62	0,77	0,26	0,54

Показник (критичний) коефіцієнта кореляції Пірсона (r) при рівні значимості  $p \leq 0,05$  для вибірки  $n=20$  дорівнює 0,44

Натомість, виявлено помірний кореляційний зв'язок між зростанням проліферативного потенціалу пухлини та дестабілізацією ДНК, сильний кореляційний зв'язок між рівнем білка p53 та ступенем фрагментації ДНК, що говорить про взаємозв'язок між рівнем мітотичної активності ракових клітин та рівнем дестабілізації геному. Наявність зв'язку між рівнем експресії MGMT та ДНК фрагментацією вказує на тісні взаємозв'язки у системі регулювання стабільності геному та синхронність їх ураження.

Отже, в процесі прогресування неопластичного процесу під впливом ВМ відбуваються якісні зміни в ДНК клітин у вигляді тотальної її фрагментації, що позначаються на рецепторному фенотипі ракових клітин, а це в свою чергу призводить до погіршення перебігу ІПРМЗ.

### 3.5.2. Дослідження метилювання ДНК у пухлинній тканині.

З метою вивчення рівня метилювання ДНК нами використано метод коливальної інфрачервоної спектроскопії. Обов'язковою умовою було позбавлення проб від допоміжних речовин (абсолютний етанол, хлороформ, фенол та інші), які використовувались для екстракції ДНК, і які могли б спричинити пригнічення спектру ДНК за рахунок накладання складових різних матеріалів дослідження. Спектри різних складових молекул ДНК характеризуються певною сталістю як діапазону коливання, так і рівня його

інтенсивності. Зумовлено це тим, що взаємодія зв'язків у межах функціональної групи характеризується суворою типовістю і тільки у незначній мірі залежить від природи вуглецевого скелету. Саме тому в дослідженні використано інфрачервону спектроскопію, яка показує найменші зміни спектру ДНК в залежності від приєднання до її структури будь-яких функціональних груп. Більш того, в залежності від рівня коливання ми визначили і природу приєднаної функціональної групи.

Згідно наших результатів, які співпали з літературними даними, діапазон коливання складових ДНК знаходиться в межах  $400-4000\text{см}^{-1}$ . Отримані інфрачервоні спектри ДНК смуги поглинання ми умовно розділили на три області: перша область відповідає спектру коливання азотистих основ ( $4000-2000\text{см}^{-1}$ ), друга – коливання  $\text{CH}_2$ -груп дезоксирибози ( $1700-1500\text{см}^{-1}$ ) та третя – коливання дезоксирибози та фосфатних груп у скелеті молекули ДНК ( $1300-1000\text{см}^{-1}$ ) (рис. 3.39).

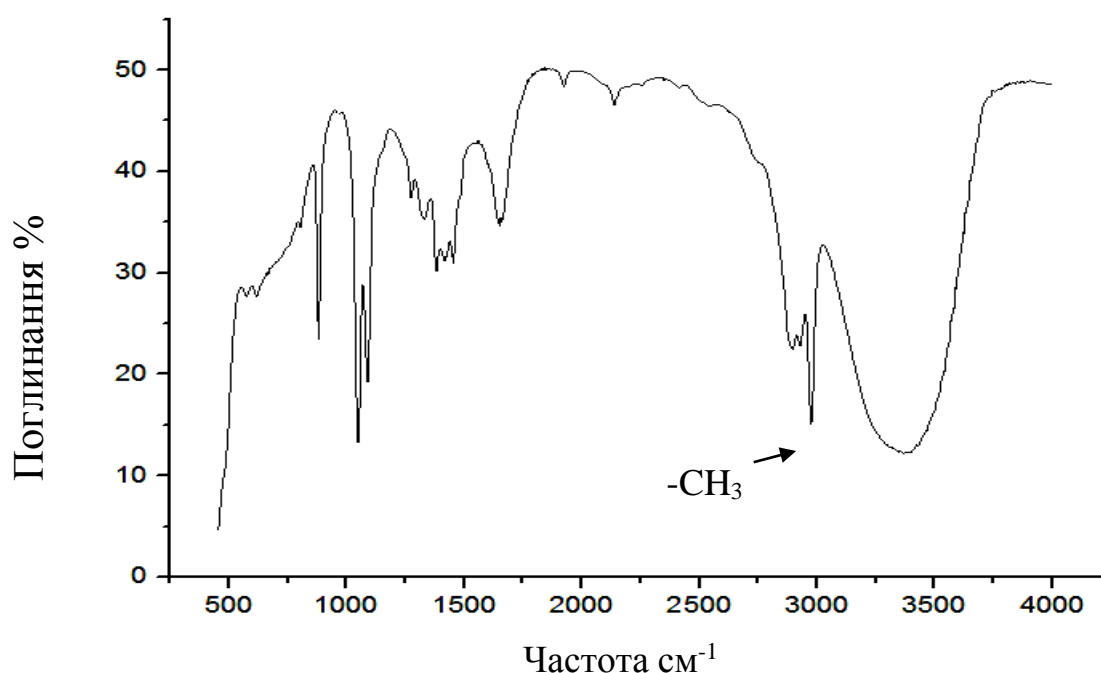


Рис. 3.39. Поляризаційний інфрачервоний спектр ДНК тканини ІПРМЗ.

У залежності від інтенсивності поглинання інфрачервоного випромінювання смуги спектру можна розділити на слабкі  $\leq 5\%$ , середні –

5%-20% та сильні –  $\geq 20\%$ . Приділялась також увага рівню проявлення коливального спектру та відстані його протяжності.

Якщо розібрати на спектри будову ДНК, то ми отримуємо, що ОН-група відображається у діапазоні від  $3700\text{см}^{-1}$  до  $3770\text{см}^{-1}$ . Сумарна інтенсивна смуга азотистих основ (аденіну, тиміну, гуаніну та цитозину) знаходяться у межах від  $2990\text{см}^{-1}$  до  $3690\text{см}^{-1}$ . Кільця цитозину та тиміну, які в своєму складі мають  $\equiv\text{C}-\text{H}$  зв'язки, здебільшого дають смугу коливання в діапазоні  $2870\text{см}^{-1}$ - $2990\text{см}^{-1}$ . Проявлення зв'язку  $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$  залишку рибози ДНК дає інтенсивну смугу у межах  $2820\text{см}^{-1}$ - $2875\text{см}^{-1}$ . Частота валентних коливань  $\text{C}-\text{N}=\text{C}$  групи цитозину знаходяться у межах  $2340\text{см}^{-1}$ - $2380\text{см}^{-1}$ , а група  $=\text{C}=\text{O}$  азотистих основ проявляється у межах  $2300\text{см}^{-1}$ - $2350\text{см}^{-1}$ . Залишок фосфорної кислоти знаходить своє відображення в діапазоні коливань від  $1190\text{см}^{-1}$  до  $1270\text{см}^{-1}$ .

Головною ж метою дослідження було виявлення рівня метилювання ДНК за показниками відхилення поглинальної хвилі у діапазоні  $2850\text{см}^{-1}$ - $3050\text{см}^{-1}$ , що відповідає коливанню метильної ( $-\text{CH}_3$ ) групи, яка знаходиться як в структурі незміненої ДНК, являючись компонентом її органічної будову (тимін ( $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ ) має у своєму складі  $-\text{CH}_3$  групу), так і додатково-приєднаної у результаті патологічного метилювання під впливом різноманітних факторів. Результати дослідження, проведеного на 40 зразках ІПРМЗ з обох груп жінок (по 20 випадків з кожної групи), показують, що спектр коливання метильної групи знаходиться у діапазоні  $2893\text{см}^{-1}$  –  $3048\text{см}^{-1}$  (рис. 3.39 та 3.40) і представлений він у 92,5% (37 випадків) одним піком, а у 7,5% (3 випадки) мало місце роздвоєння поляризаційного інфрачервоного спектру коливання  $-\text{CH}_3$  групи (рис. 3.40).

Пік коливання  $-\text{CH}_3$  групи знаходився в діапазоні  $2920\text{см}^{-1}$ - $2991\text{см}^{-1}$ . Щодо інтенсивності коливання, за результатом поглинання інфрачервоного випромінювання, то вона була в межах від 76,15% до 98,72% (у середньому 89,71%), тобто її можна віднести до сильного поглинального спектру. Враховуючи зміни інтенсивності коливання  $-\text{CH}_3$  можна припустити, що

ДНК мала різну кількість  $-CH_3$  груп, що говорить про наявність різного рівня метилювання ДНК. Тому як коливання  $-CH_3$  групи відбувається у діапазоні коливання азотистих основ ( $4000-2000\text{cm}^{-1}$ ), можна припустити, що процесу патологічного метилювання підлягають саме аденін, гуанін, цитозин або додатково приєднує метильну групу тимін.

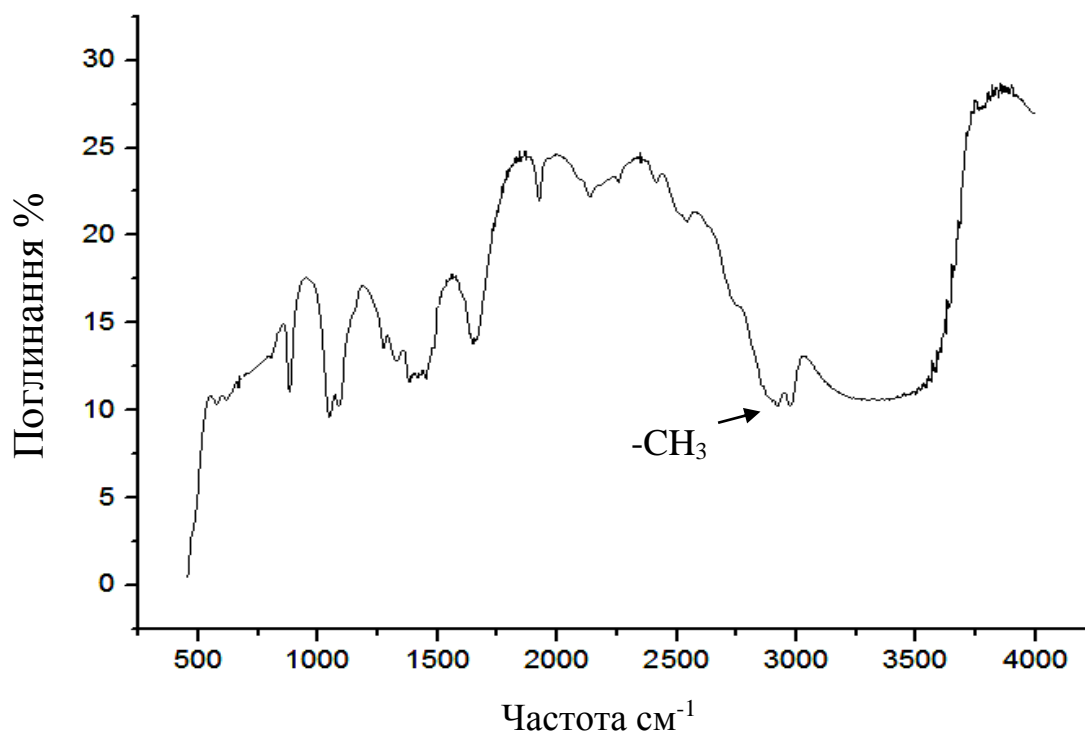


Рис. 3.40. Поляризаційний інфрачервоний спектр ДНК тканини ІПРМЗ.

При порівнянні результатів інфрачервої спектроскопії виявлено, що рівень метилювання ДНК у жінок з першої групи вищий за його показники у тканині від хворих, що мешкають в «екологічно-чистих» районах Сумської області.

В табл. 3.18 наведені статистичні характеристики кореляційного аналізу отриманих результатів при проведенні ІГХ дослідження, хімічного складу тканини і рівня метилювання ДНК.

Статистичний аналіз отриманих результатів вказує на позитивний кореляційний зв'язок ( $r=0,41$ ) між рівнем накопичення ВМ у тканині ІПРМЗ та рівнем метилювання ДНК, що є індикатором участі надмірного

надходження останніх до пухлинної тканини у патологічному метилюванні генетичного матеріалу. Також виявлено помірний позитивний кореляційний зв'язок між рівнем експресії MGMT та рівнем метилювання ДНК ( $r=0,53$ ), між рівнем поглинання інфрачервоного спектру та рівнем експресії p53 ( $r=0,41$ ).

Таблиця 3.18

Взаємозв'язок між показниками експресії рецепторів тканиною ІПРМЗ, рівнем метилювання ДНК та елементним складом пухлини, враховуючи коефіцієнт кореляції Пірсона ( $r$ )

	<b>MGMT</b>	<b>BM</b>	<b>ER</b>	<b>PR</b>	<b>HER2</b>	<b>Ki-67</b>	<b>P53</b>	<b>bcl-2</b>
<b>Мет. ДНК</b>	<b>0,53</b>	<b>0,41</b>	<b>-0,27</b>	<b>-0,3</b>	<b>0,04</b>	<b>0,17</b>	<b>0,41</b>	<b>0,22</b>

Показник (критичний) коефіцієнта кореляції Пірсона ( $r$ ) при рівні значимості  $p \leq 0,05$  для вибірки  $n=40$  дорівнює 0,31

Важливим моментом є дослідження взаємозв'язку між різними патологічними модифікаціями генетичного матеріалу, адже всі вони пов'язані між собою та фенотипом клітин. Так, при співставленні результатів електрофоретичного дослідження фрагментації ДНК з результатами спектрального аналізу ДНК виявлено позитивний кореляційний зв'язок ( $r=0,49$ ), що підтверджує синхронність дестабілізації генетичного матеріалу при прогресуванні пухлинного процесу.

Аналізуючи отримані результати, можна констатувати, що надмірна кількість BM у пухлинній тканині знаходить своє відображення не тільки на гістологічній картині ІПРМЗ, її рецепторному профілю, а й на рівні дестабілізації генетичного матеріалу, який проявляється зростанням фрагментації та метилювання ДНК. Це в свою чергу знаходить відображення

на рецепторному фенотипі клітин і, відповідно, на перебігу злякисного процесу в МЗ.

Узагальнюючи результати всіх методів дослідження, можна стверджувати, що при надходженні СВМ до жіночого організму у підвищеній кількості останні знаходять своє відображення у ініціюванні пухлинного процесу та безперервно супроводжують прогресування неоплазії, яке проявляється кількісними і якісними змінами гістологічної картини, фенотипічного рецепторного профілю ракових клітин та різним рівнем дестабілізації генетичного матеріалу.

**Матеріали з даного розділу висвітлені в наступних публікаціях:**

1. Lyndin M. Pathogenetic mechanisms of heavy metals effect on proapoptotic and proliferative potential of breast cancer / A. Romaniuk, M. Lyndin, R. Moskalenko, Ye. Kuzenko, O. Gladchenko, Yu. Lyndina // *Interventional Medicine & Applied Science*. – 2015. – Vol. 7 (2). – P.63 – 67.

2. Lyndin M. Immune microenvironment as a factor of breast cancer progression / A. Romaniuk, M. Lyndin // *Diagnostic Pathology*. – 2015. – Vol. 10 (79). – DOI 10.1186/s13000-015-0316-y.

3. Линдін М.С. Дослідження рецепторів естрогену, прогестерону та her-2/neu в тканині раку молочної залози в умовах впливу солей важких металів / А.М. Романюк, М.С. Линдін, Р.А. Москаленко, А.В. Золотарьова // *Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень*. – 2014. – №2 (2). – С. 168 – 175.

4. Линдін М.С. Морфологія біомінералізаторів у тканині раку молочної залози та експресія рецепторів остеопонтину / А.М. Романюк, М.С. Линдін, Р.А. Москаленко, О.М. Гортинська // *Клінічна та експериментальна медицина*. – 2014. – №3 (64). – С. 121 – 123.

5. Линдін М.С. Морфологічні та біохімічні особливості раку молочної залози в умовах забруднення довкілля солями важких металів /

А.М. Романюк, М.С. Линдін, Р.А. Москаленко, Є.В. Кузенко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – №1(113). – С. 318 – 322.

6. Линдін М.С. Вплив запальної інфільтрації на експресію рецепторів hsp90 $\alpha$  в тканині раку молочної залози / А.М. Романюк, М.С. Линдін, Л.І. Карпенко, А.Ю. Будко, Ю.М. Линдіна, О.В. Логвінова // Журнал клінічних та експериментальних медичних досліджень. – 2015. – №3 (1). – С. 38 – 43.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Наше сьогодення характеризується зростанням впливу екологічних негараздів на здоров'я людей [40,42-46,48]. Різноманітні екзогенні фактори, які надходять у підвищеній кількості до жіночого організму, також знаходять своє шкідливе відображення і в МЗ. Не зважаючи на доволі добре вивчений канцерогенний вплив спадковості та дисгормональних розладів на ініціювання канцерогенезу [28,30,31,33], в літературі залишалися неоднозначними відомості про вплив підвищеного надходження СВМ на ініціювання та перебіг РМЗ [49-53]. Без сумніву, ВМ – це життєво необхідні МЕ, які приймають участь у життєдіяльності всіх клітин організму [89,91,92,94], але функція їх змінюється при надходженні цих МЕ у надлишковій кількості до внутрішньоклітинного середовища, в результаті чого есенціальні МЕ починають проявляти токсичні функції [84,85]. Це призводить до блокування активності фізіологічних каталітичних систем клітини та активацію патологічних внутрішньоклітинних механізмів функціонування епітеліоцитів [96,97,99].

Як відомо, існує декілька шляхів зростання концентрації ВМ як в судинному руслі, так і периферійних тканинах: порушення метаболізму МЕ, які потрапляють у фізіологічних концентраціях до організму [149,171,172], роботі жінок у шкідливих умовах та інші [135,152]. Але питання зростання кількості ВМ в організмі жінок найбільш гостро стоїть у тих регіонах, де навколишнє середовище забруднене СВМ, які мають можливість надходити до жіночого організму як з продуктами харчування, так і з водою [12,13]. Саме такими районами в Сумській області згідно епідеміологічних досліджень є С-Будський, Шосткинський та Ямпільський райони [14]. Жінки

з цих районів з діагнозом РМЗ і склали першу піддослідну групу нашої роботи. З метою оцінки впливу надлишкової екзогенної кількості СВМ на неопластичний процес ми в групу порівняння взяли випадки РМЗ з відносно «екологічно-чистих» районів області.

Як показують результати епідеміологічного дослідження захворюваність на РМЗ має тенденцію до зростання, про що свідчить збільшення кількості прооперованих хворих в Сумському обласному клінічному онкологічному диспансері з приводу захворювання МЗ на 37% в період з 2004р. по 2014р., серед яких випадки виявлення РМЗ зросли з 39% до 46% в структурі захворювання МЗ. Знаходить своє відображення в розподілі на захворюваність РМЗ і вплив навколишнього середовища. Так, згідно результатів статистичної обробки матеріалів, ми виявили, що у жінок з «екологічно-чистих» районів області випадки виявлення неоплазії в МЗ майже у 2 рази рідше (на 100 тис. населення) зустрічаються ніж у мешканок «екологічно-забруднених» регіонів Сумської області. Це свідчить про участь оточуючого середовища, поряд з добре-вивченими етіологічними факторами, на ініціювання злоякісного процесу в МЗ, що було також продемонстровано у інших епідеміологічних та експериментальних дослідженнях [111,148, 160,183].

Отримані дані гістологічного дослідження показують, що у загальній структурі злоякісних новоутворень МЗ найвагомніше місце займає ІІРМЗ (90%) серед поодинокі виявлених випадків медулярного раку, раку Педжета, часточкового інфільтративного та неінфільтративних випадків часточково-протокових карцином. Дані дослідження дещо перевищують частоту виявлення ІІРМЗ в інших дослідженнях (до 80%) [55], що може бути пов'язано як зі незначними похибками в диференційній діагностиці гістологічних форм РМЗ, так і етнічними особливостями протікання злоякісного новоутворення у жінок України. Відсутність статистично достовірних відмінностей гістологічних варіантів РМЗ у жінок, які ввійшли в обидві групи дослідження, вказує на незалежність розвитку якогось

гістологічного варіанту РМЗ від екзогенного надходження СВМ до жіночого організму.

Саме відсутність значної різниці у частоті виявлення окремих гістологічних варіантів РМЗ і слугувало умовою для прийняття рішення про проведення наступних досліджень на тканині ППРМЗ (94 випадки), як на тих, що найчастіше виявляються у жінок. Було виявлено відсутність залежності віку хворих, який був у діапазоні 42-76 років, від місця їх проживання. У більшості випадків у групи дослідження входили жінки пременопаузного та менопаузного періоду, як періоду частішого виявлення у них РМЗ (середній вік 59 років). З іншого боку враховувалось довготривале проживання онкохворих на досліджуваній території, що могло вплинути на морфогенез злоякісного процесу.

Згідно результатів клінічних та макроскопічних досліджень РМЗ статистичних відмінностей не виявлено. Пухлина у більшості випадків знаходилась у лівій молочній залозі (58%) та у верхньозовнішньому та центральному квадрантах (73%). У 39% випадків РМЗ виявлялися метастатичні ураження від 1 до 10 регіонарних лімфатичних вузлів, у 3 випадках мало місце гематогенне його поширення, у 4 випадках виявлено проростання неоплазії на шкіру. Збільшення частоти виявлення метастазів у першій групі, ніж у другій говорить про переважання лімфогенного поширення пухлини при підвищеному надходженні СВМ до жіночого організму, що також показано в інших дослідженнях [148,172,175].

При аналізі гістологічних препаратів виявлений факт зростання більш злоякісних варіантів ППРМЗ (G2-G3) у першій групі (87% проти 67% у другій групі). Це говорить про участь ВМ у прогресуванні пухлинного процесу, який супроводжується підвищенням рівня проліферативної активності клітин, зростанням ступеню їх атипії та прогресуючої анаплазії. Залишалось постійно відкритим питання, яким чином екзогенне надходження СВМ може викликати прогресування неоплазії, яке ми і намагалися розкрити у

проведених гістологічних, гістохімічних, імуногістохімічних та молекулярно-генетичних дослідженнях.

Як показують результати атомно-абсорційної спектрофотометрії тканина ППРМЗ містить у своєму складі різну кількість ВМ. Як і у випадку інших досліджень [148,170,180], їх кількість зростає при підвищеному надходженні останніх до організму з навколишнього середовища. Так, при порівнянні елементного складу двох груп тканин, виявлено достовірну різницю у накопиченні ВМ у пухлинній тканині ( $p < 0,05$ ), яка у першій групі на 22,4% була більшою за їх кількість у другій групі. Це є вагомим підтвердженням того, що пухлинна тканина здатна до накопичення ВМ у процесі свого морфогенезу, і їх кількість залежить від рівня екзогенного надходження СВМ до жіночого організму. Той факт, що кількість Fe, Cu, Zn, Cr, Ni та Pb у неопластичній тканині переважає над її показниками у інтактній тканині МЗ та метастатичних вогнищах, говорить про зростаючу спроможність ракової тканини до абсорбції з кровообігу ВМ та пролонгованість цього процесу [162,170].

Результати гістологічного дослідження, спрямовані на вивчення вторинних змін у пухлинній тканині, показують, що неопластичний процес у більшості своїх випадків супроводжується наявністю патологічної мінералізації, крововиливів, запальної інфільтрації навколо пухлинного простору. Беручи до уваги наявність різних гістологічних варіантів мінералізації ППРМЗ можна припустити, що у процесі її формування приймають участь декілька факторів, які виступають як активаторами, так і інгібіторами петрифікації тканини РМЗ [68-70]. Наше дослідження з вивчення цього питання було спрямоване у двох напрямках – це з'ясування участі ВМ у процесі мінералізації пухлинної тканини та вивчення участі білка OPN у цьому процесі. Тобто, ми враховували вплив як екзогенних, так і ендогенних факторів на процес петрифікації тканини ППРМЗ. За результатами наших досліджень встановлено, що патологічна

біомінералізація на 19% частіше зустрічається в першій групі ніж у другій, що не може не вказувати на участь МЕ на процес мінералоутворення.

Згідно отриманих даних за допомогою енерго-дисперсійної спектроскопії можна припустити, що такі МЕ як Fe, Zn, Cu, Cr та Ni, потрапляючи до пухлинної тканини, заміщують іони кальцію у складі його солей. Враховуючи кальцієво-фосфорне співвідношення у біомінералізатах РМЗ (за даними енерго-дисперсійної спектрометрії), яке дорівнює 1,56-1,73, можна стверджувати, що мінералізати пухлинної тканини є не що інше, як відкладання ГА, у якому іони кальцію заміщені на більш важкі катіони, що погоджується з даними інших досліджень [72,73]. ВМ можуть заміщувати іони кальцію у зовнішній частині молекули ГА. Не виключається можливість заміщення атомів кальцію у центральному ядрі мінералізату [334]. Це призводить до підвищення молярної маси молекули ГА (атоми цинку, заліза, хрому, нікелю та міді мають більшу молярну масу, ніж кальцій, у якого вона дорівнює 40,078ао), зменшення її розчинності та підвищення можливості відкладатися в пухлинній тканині (рис. 4.1).

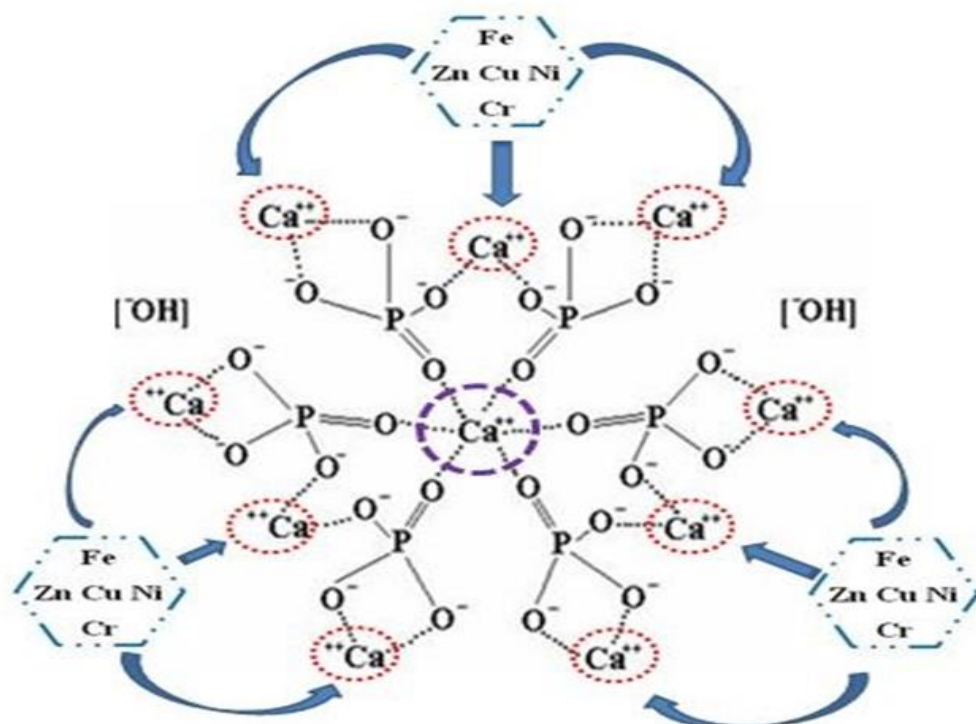


Рис. 4.1. Схема заміщення кальцію на інші МЕ.

За умови надлишкового накопичення вищезазначених елементів у тканині МЗ вони призводять до активації перекисного-окиснення ліпідів, утворення перекису водню та супероксид-аніонів [100,105,106]. Це стимулює розвиток запалення, апоптоз та некроз у тканині, що стає передумовою патологічної біомінералізації (як варіант дистрофічного звапнення). При пролонгації патології в процес залучаються оточуючі тканини, з чим пов'язано наявність обідка мінералізації навколо більш структурованих відкладань ГА. Участь ВМ у процесі петрифікації пухлинної тканини МЗ можна розглядати ще і через механізм прямого осадження та зв'язування з органічною матрицею (білками). Аналізуючи вищезазначене, можна стверджувати, що надходження Fe, Zn, Cu, Cr та Ni у тканину ІПРМЗ стимулює процес патологічної мінералізації, що у свою чергу призводить до прогресування перебігу пухлинного процесу.

Як було зазначено, процес біомінералізації тканини ІПРМЗ вивчено з позиції участі в ньому і ендogenous фактору, яким виступає OPN. Наявність прямого кореляційного зв'язку між петрифікацією та експресією OPN вказує на безпосередню участь останнього у формуванні вогнищ мінералізації у тканині РМЗ, що співпадає з літературними даними [267,335,336]. Молекула OPN, з'єднуючись з солями кальцію, стимулює відкладання останніх у вигляді конгломератів [337,338]. Наявність внутрішньоклітинної реакції при забарвленні алізариним червоним S вказує на внутрішньоклітинний початок мінералоутворення, в результаті чого, утворення конкрементів відбувається як інтрацелюлярно, так і екстацелюлярно. Більше того, встановлено зв'язок між рівнем експресії білка та ступенем анаплазії пухлинної тканини, що вказує на набуття якостей мінералоутворення в процесі прогресування ІПРМЗ [265,266,268]. Враховуючи цей факт дещо відкритим залишається питання первинності складових одного і того процесу, а саме, чи процес анаплазії призводить до набуття раковими клітинами OPN-синтетичної функції, чи синтез OPN призводить до зниження

ступеню диференціювання ІПРМЗ. У будь-якому випадку це веде, як і у випадку екзогенного надходження ВМ, до біомінералізації тканини РМЗ.

Наявність відкладень солей кальцію стимулює активацію імунної відповіді, призводячи до виникнення хронічного вогнища запалення навколо «стороннього тіла» [339,340]. Постійний тісний контакт ракових клітин з ГА, за рахунок синтезу інтерлейкіну 8, призводить до зростання спорідненості неопластичних клітин до кальцієвмісної тканини з наступним розвитком метастатичного ураження кісткової тканини [331-343]. Наявність ГА в пухлинній тканині посилює мітогенну активність пухлинних клітин та синтез прогностично-несприятливих білків (матрисних металопротеїназ 2,9,13, простагландину Е) [344,345]. Загальний механізм участі ВМ в біомінералізації тканини ІПРМЗ зображено на рис. 4.2.

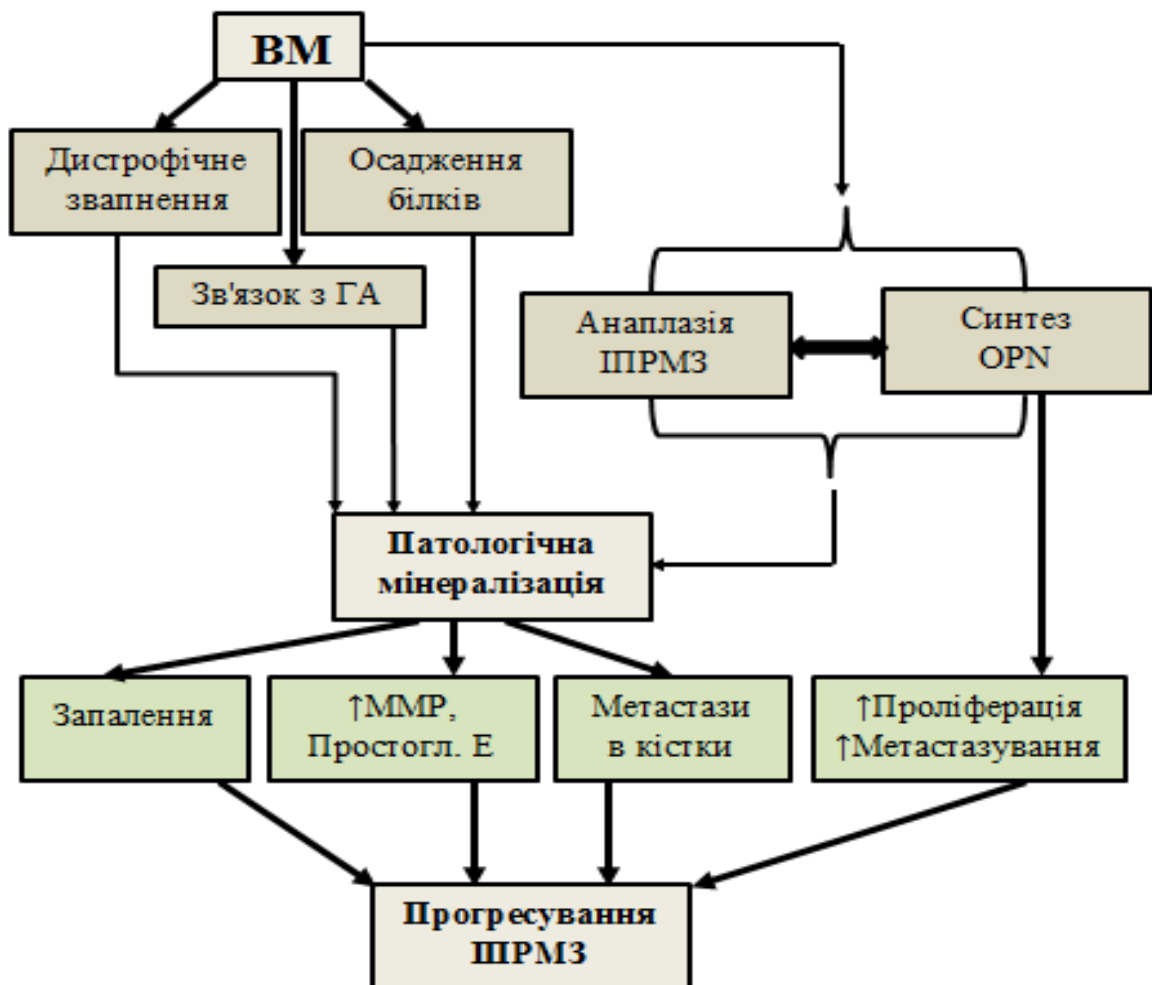


Рис. 4.2. Схема взаємозв'язку між надходженням ВМ до тканини МЗ та синтезом ОРН і процесом прогресування ІПРМЗ.

Наступною гістологічною ознакою прогресування ІПРМЗ, яку ми вивчали за допомогою забарвлення препаратів гематоксилін-еозином та ІГХ методом з використанням антитіл до VEGF, було визначення рівня васкуляризації пухлинної тканини та наявності прихованого потенціалу у ракових клітин до цього процесу. Як показують результати дослідження, неопластична тканина має різний ступінь васкуляризації, який залежить від кількох факторів. По-перше, наявність позитивного кореляційного зв'язку між рівнем васкуляризації, рівнем експресії VEGF та ступенем диференціювання ІПРМЗ вказує на посилення ангиогенезу в процесі анаплазії пухлини. По-друге, наявність зв'язку між експресією VEGF та накопиченням ВМ в пухлинній тканині говорить про посилення ангиогенезу у міру надходження МЕ до неопластичної тканини [165,174,176]. Пояснюється цей факт тим, що при накопиченні у пухлині ВМ, серед яких міститься також Си, відбувається посилення інтенсивності ангиогенезу, який прямо або опосередковано залежить від рівня міді. Міграція ендотеліальних клітин є важливим першим кроком у ангиогенезі, а мідь, як було показано, викликає міграцію ендотеліальних клітин, що було підтверджено як *in vitro* так і *in vivo* [165,346,347]. Мідь-зв'язані молекули не є ангиогенними, хоча звільнена з комплексу мідь набуває ростових властивостей [166,167]. Білки VEGF зв'язуються на поверхні ендотеліальних клітин з рецепторами, які виникають під дією речовин, що виробляє сама пухлина (на поверхні нормальних клітин ендотелію в здоровому організмі такі рецептори відсутні). Як тільки молекула VEGF зв'язалася з рецептором, ініціюється цілий каскад біохімічних подій: клітини ендотелію починають інтенсивно ділитися і «запускають» синтез ферментів – металопротеїназ, які розщеплюють оточуючий ендотелій позаклітинний матрикс і оболонку судин. При цьому в новоутворені «дірки» починають виходити ендотеліальні клітини, які мігрують у напрямку до пухлини [348].

У підсумку це призводить до покращення кровопостачання пухлини та зростання спроможності її до метастазування [349,350]. При цьому, як і в

більшості процесів, які виникають в пухлинній тканині, утворюється патологічне коло (рис. 4.3). При зростанні надходження ВМ, а саме Cu, до пухлинної тканини МЗ посилюється процес ангиогенезу, який стимулює зростання кількості судин. Новоутворені капіляри мають функціонально нестабільну судинну стінку, яка, по-перше, більш доступна для проростання раковими клітинами і метастазування, по-друге, процеси абсорбції всіх речовин, в тому числі і ВМ, відбуваються інтенсивніше, ніж у інтактній тканині МЗ [346]. Це знову ж таки призводить до накопичення МЕ в пухлинній тканині і запуску всіх його патологічних впливів на морфогенез неопластичного процесу.

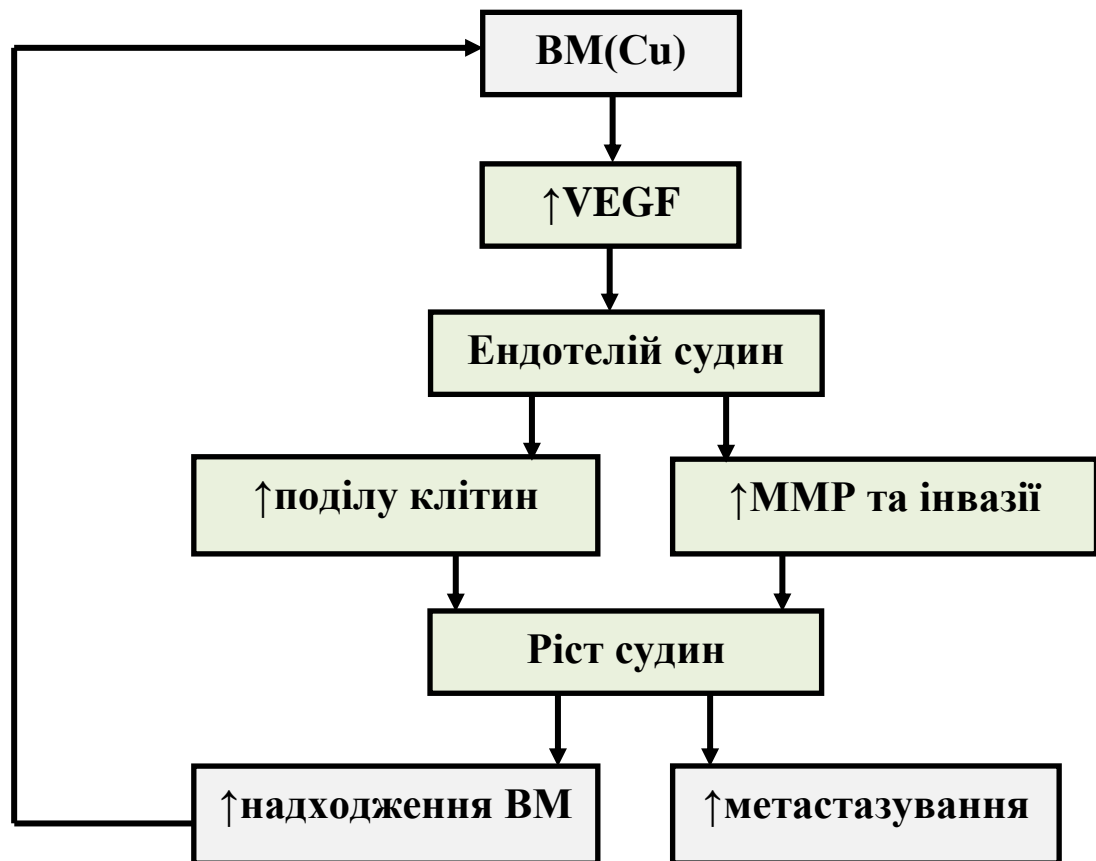


Рис. 4.3. Схема впливу ВМ на прогресування васкуляризації пухлинної тканини.

Наші дослідження стосовно вивчення експресії ER та PR, показують, що у жінок, які мешкають в «екологічно-забруднених» регіонах Сумської

області, їх рівень нижчий за той, що виявлено в групі порівняння ( $t=1,95$ ,  $p=0,026$ ). Це ж саме стосується і порівняння між жінками з однаковим ступенем диференціювання тканини ППМЗ в обох групах. За великим рахунком, це є найбільш прогностично-негативним показником впливу ВМ на перебіг злякисного процесу у МЗ, тому як наявність стероїдних рецепторів є найпотужнішим прогностично-сприятливим маркером перебігу захворювання і чутливістю пухлини до терапії [220,221,224-226]. Вплив на наявність рецепторів у пухлинних клітинах відбувається за рахунок цілої низки патологічних стимулів, в результаті чого утворення складових компонентів рецепторів та експресії їх раковими клітинами зменшується або зникає взагалі. Одним з факторів, який впливає на рецепторний фенотип клітин, виявився ступінь анаплазії пухлини. Аналогічно результатам інших досліджень [221], виявлено статистично-достовірну закономірність зменшення експресії рецепторів до стероїдних гормонів у процесі прогресування пухлинного росту. На підставі цього можна говорити про функціональне спрощення ракових клітин, враховуючи факт наявності рецепторів до естрогену та прогестерону в нормальному епітелії МЗ та у високодиференційованих аденокарциномах стероїд-чутливих органів [211,219]. В інший механізм впливу на ER та PR безпосередньо або опосередковано залучені ВМ. Саме на цей факт вказує зниження рівня експресії рецепторів при зростанні накопичення ВМ у пухлинній тканині. Як відомо, більшість з них мають естрогеноподібну активність, виступаючи в якості «екологічних естрогенів» [189,190,227,228]. Один з механізмів інгібуючого впливу МЕ пропонується розглядати через процес виснаження рецепторів. ВМ, постійно надходячи до пухлинної тканини та взаємодіючи з рецепторами, спочатку викликають процес їхнього стимулювання, що призводить до зростання неконтрольованого поділу клітин (естроген стимулює проліферативну активність клітин [213,215]), а при пролонгації процесу – до їхнього виснаження.

Інший механізм впливу ВМ може реалізовуватись за участі дестабілізації генетичного матеріалу, тому як ці метали при зростаючих концентраціях можуть каталізувати пошкодження ДНК, приймаючи участь у порушенні її реплікації, транскрипції та трансляції [99], дестабілізуючи процес переходу ДНК зі стану спіраль-клубок [100], викликаючи розриви хімічних зв'язків в ланцюгу нуклеїнових кислот [213,218]. Вплив ВМ на ДНК може також реалізовуватись через участь у ПОЛ та утворенні АФК, які в подальшому дестабілізують геном [15,16,138,143]. На кількість ER та PR впливають також рівень метилювання ДНК, наявність білка MGMT та запальна навколишня інфільтрація пухлинного вогнища.

Наявність негативного кореляційного зв'язку між експресією стероїдних рецепторів та прогностично-несприятливих маркерів (HER2/neu, Ki-67, p53) говорить про фенотипічне спрощення ракових клітин, які виходять з-під контролю регуляторних систем макроорганізму [234,235,351,352], у нашому дослідженні під впливом ВМ.

Виявлена присутність тісного кореляційного зв'язку ( $r=0,8$ ) між експресією до естрогену та прогестерону є індикатором їхньої синхронної участі у функціонуванні клітин та підтверджує факт синтезу PR тільки за умови наявності ER та стимулів, які надходять від них, бо як відомо ген кодування рецепторів прогестерону є естроген-залежним [216-218].

Враховуючи наявність зв'язку між рівнем накопичення ВМ в тканині ІПРМЗ і рівнем експресії HER2/neu, можна стверджувати про вплив мікроелементного складу тканини на чутливість до факторів росту [229,232]. Реалізація цього механізму може відбуватися або за безпосереднього впливу ВМ на ДНК, яке призводить до ампліфікації гену ERBB2, або за рахунок стимуляції синтезу шаперонів, які залучені у механізми стабілізації HER2/neu та передачі сигналів до мітотичних посередників [276-279]. Наявність кореляційного зв'язку між ступенем експресії білків Ki-67 та епідермального фактору росту є індикатором участі HER2/neu в надаванні раковим клітинам

проліферуючого потенціалу, що призводить до прогресування неопластичного процесу у МЗ.

Як відомо, всі процеси як в організмі в цілому, так і в клітині зокрема, суворо контролюються регуляторними системами. Одним з найпотужніших білків, який контролює рівень проліферативної активності, репарацію ДНК та залучення клітини в апоптичний ланцюг змін є p53 [244,245]. Як показують наші результати, білок p53 було виявлено у 40% випадків ІПРМЗ. Згідно літературних даних, ми мали можливість виявити лише mt p53, який має доволі пролонгований період напіврозпаду, wt p53 ІГХ методами виявити неможливо [351]. В результаті мутацій mt p53 накопичується в клітині, імітуючи наявність проапоптичного «дикого» p53, в результаті чого клітина набуває «автономії», запускаючи каскади проліферативних стимулів та антиапоптичні сигнали, що приводять до прогресування злоякісного процесу [244,246,247].

Ми виявили зв'язок між накопиченням ВМ та рівнем експресії p53. За рахунок впливу на ген P53, ME інгібують регуляторну «сторожеву» функцію wt p53. Ці дані підтверджуються і результатами наших досліджень: встановлено кореляційну залежність ( $r=0,49$ ) між експресією білків p53 та Ki-67 пухлинними клітинами ІПРМЗ. Слід зазначити, що згідно даних, отриманих в процесі ІГХ дослідження Ki-67 та атомно-абсорбційної спектрофотометрії, також мала місце наявність кореляційного зв'язку ( $r=0,52$ ) між вмістом ВМ у пухлинній тканині і рівнем проліферативної активності клітин. На рис.4.4 показано механізм впливу ВМ на проліферативну активність клітин та її програмовану загибель.

Аналізуючи схему, можна стверджувати, що під впливом ВМ відбувається підтримання ще одного патологічного кола прогресування пухлинного процесу: посилюється мітотична активність ракових клітин, яка відбувається за умови відсутності будь-якого блоку (відсутність wt p53), в результаті чого в ДНК виникають все нові і нові мутації, в тому числі і гену P53. У підсумку має місце утворення mt p53, який інгібує синтез wt p53, в

результаті чого зникає репаративний блок на  $G_1$  та  $G_2$  фазах клітинного циклу і ініціюється проліферативна активність клітин [245,247]. Патологічне коло замикається. Все вищезазначене приводить до посилення стійкості пухлинних клітин до хіміотерапевтичних препаратів та ініціювання прогресування неопластичного процесу [249,251,254].

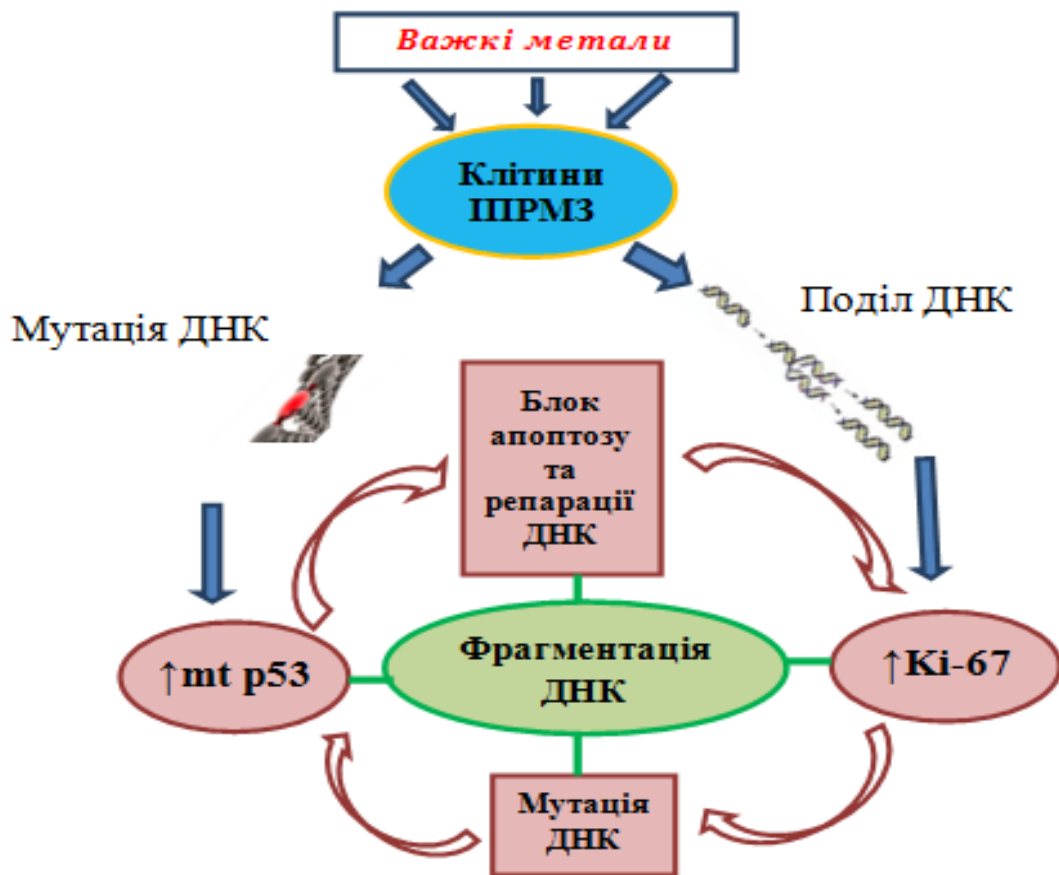


Рис. 4.4. Патогенетичні ланки пухлинної прогресії ІПРМЗ.

Вищезазначені зміни продовжують прогресувати і у периферійних метастатичних вогнищах, про що говорить більш яскраво виражена ІГХ реакція по виявленню рецепторів p53 та Ki-67 у відсівах пухлини в регіонарних лімфатичних вузлах.

Не випадковою обставиною є поєднання, згідно результатів нашого дослідження, і вираженого поліморфізму ракових клітин (патологічні мітози, багатоядерність, збільшення індексу Гертвіга та інші) з посиленою експресією p53. Це підтверджує наявність дестабілізації процесів

регулювання поділу клітин та відсутності ініціювання репаративних процесів.

Не менш важливою функцією «дикого» типу білка p53 є блокування синтезу антиапоптичного білка bcl-2, який запобігає виходу цитохрому C з мегаканалів мітохондрій та зв'язує фактор APAF1, що ініціює апоптоз [253,255]. Результати нашого дослідження показують, що між двома показниками експресії (p53 та bcl-2) існує позитивний кореляційний зв'язок, що, виходячи з основної функції p53, не мало б відбуватися [244,246]. Але, якщо взяти до уваги, що в процесі канцерогенезу, в пухлинних клітинах синтезується не wt p53, а mt p53, який інгібує як утворення «дикого» типу проапоптичного білка, так і його функцію, то все стає на свої місця. При надлишковій кількості mt p53 відбувається зменшення кількості wt p53, що призводить до пригнічення блокування вищезазначених ланок апоптозу, а це в свою чергу надає клітині можливості до подальшого функціонування і прогресування злякисного процесу (рис.4.5).

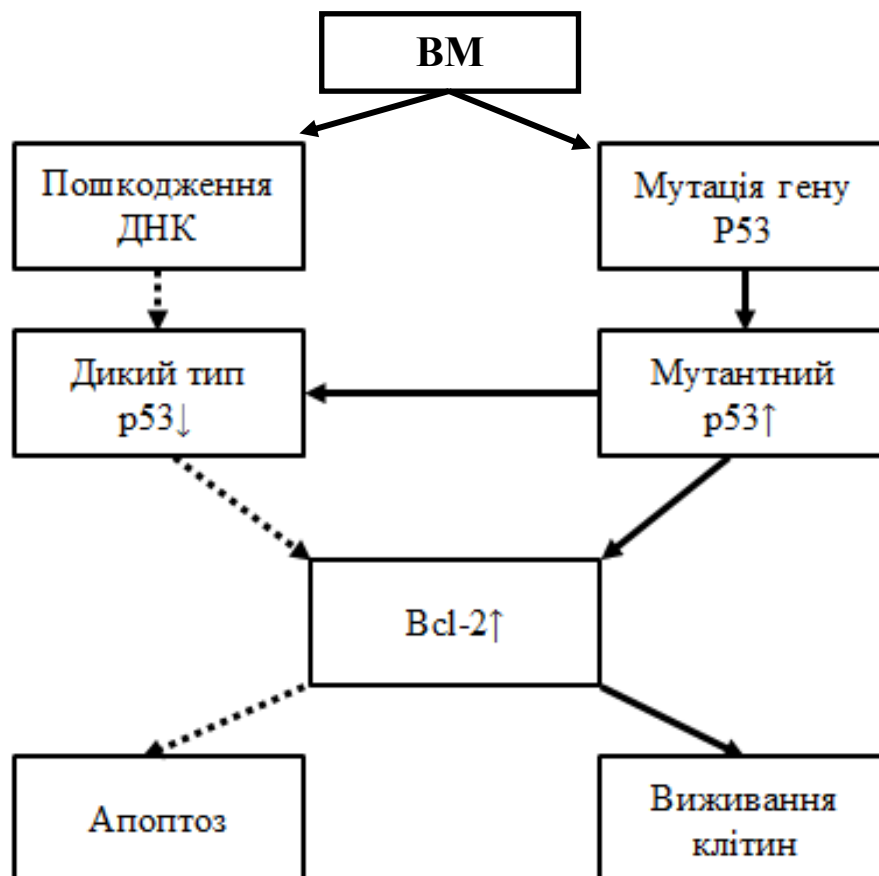


Рис. 4.5. Регуляція апоптозу диким і мутантний p53.

Також результати нашої роботи вказують на можливість безпосереднього впливу ВМ на наявність у клітині білків bcl-2 ( $r=0,29$ ), надаючи пухлині стійкості в боротьбі з макроорганізмом. Не є випадковими і результати, щодо поєднання у 92% випадків експресії ER та bcl-2, бо, згідно результатів літературних даних, ген Bcl-2 є, як і у випадку гену, який кодує PR, естроген-залежним геном [353,354].

В окремих дослідженнях показано, що присутність bcl-2-рецепторів є сприятливим прогностичним фактором [355]. У той час, як наявність рецепторів до bcl-2 є ніби важливим прогностичним маркером у перебігу РМЗ, його чітка роль в якості терапевтичної мішені залишається невідомою [356]. Ми вважаємо, що присутність білків bcl-2 не є показником сприятливого перебігу пухлинного процесу. Це один із способів поліпшення реалізації проліферативного потенціалу клітин через ER. Оскільки однією з функцій естрогену є посилення клітинного поділу, він може бути реалізований або шляхом транскрипції естроген-залежних генів, відповідальних за проліферативну активність клітин, або за допомогою активації транскрипції естроген-залежних генів, які блокують апоптоз, яким і є ген Bcl-2. На наш погляд наявність bcl-2 вказує на більш агресивний перебіг РМЗ, хоча деякі автори вважали його прогностично-сприятливим фактором у зв'язку з наявністю в більшості випадків рецепторів до стероїдних гормонів, які є прогностично-сприятливими маркерами РМЗ. Це підтверджується покращенням результатів лікування при використанні інгібіторів bcl-2 (ВНЗ міметиків) [357].

Поширення злякисного процесу на навколишні тканини та їх метастазування можливе за рахунок декількох факторів: неконтрольований ріст, втрата адгезивних властивостей, розщеплення навколишніх тканин. Останній процес стає можливим за рахунок набуття раковими клітинами протеїназної активності. Одним з таких маркерів виступає MMP1 [258,290,291]. Як показали результати нашого дослідження, неопластичні клітини РМЗ майже у 60% випадків володіли цією функцією, що вказує на

спроможність до безмежного поширення [285,293]. Наявність кореляційного зв'язку між кількістю MMP1 та хімічним складом тканини ІПРМЗ, а саме рівнем цинку, говорить про участь останнього у процесі посилення міграційної активності пухлини МЗ. Пояснити цей факт можна тим, що MMP1 є цинквмісним ферментом [284], і при підвищеному надходженні Zn до пухлинних клітин, він використовується на утворення цього білка, що є індикатором негативного впливу ВМ на перебіг злоякісного процесу.

Дослідження адгезивних властивостей пухлинних клітин РМЗ показують, що в міру накопичення ВМ в пухлинній тканині МЗ знижується рівень експресії Е-кадгерину, який є індикатором сили міжклітинної взаємодії [285,294]. Не випадковим є і негативний кореляційний зв'язок між експресіями Е-кадгерину і MMP1, враховуючи факт поширення пухлинного процесу при наявності колагеназної активності у випадку присутності позитивної ІГХ реакції при дослідженні MMP1 та зменшення сили міжклітинних контактів за умови зниження експресії Е-кадгерину. Це ж саме стосується і наявності віддалених метастазів, наявність яких супроводжується зниженням внутрішньоклітинного білка Е-кадгерину і зростання експресії MMP1 [299,301,358,359]. На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що в міру накопичення ВМ у пухлинній тканині остання набуває додаткових можливостей до розповсюдження, що знижує як виживаність хворих жінок, так й можливість радикального оперативного втручання за наявності стрімкого росту неоплазії і появи метастатичного ураження лімфатичних вузлів.

Відомо, що пухлинні клітини характеризуються рядом ознак: продукцією власних і незалежних від екзогенних сигналів факторів росту, нечутливість до інгібуючих ріст сигналів, ухилення від апоптозу, необмежена можливість реплікацій, підтримка ангиогенезу, можливість давати метастази [360]. Як відомо, hsp90 та інші шаперони відіграють важливу роль у набутті і підтримці кожної з цих ознак [361-363]. Згідно результатів нашого дослідження майже у 80% випадків виявлено позитивну

реакцію щодо експресії hsp90 $\alpha$ , що вказує на набуття раковими клітинами в процесі морфогенезу вищезазначених функцій. Хоч і не виявлено прямого кореляційного зв'язку між накопиченням ВМ у пухлинній тканині та рівнем внутрішньоклітинної кількості білків шаперону, при порівнянні результатів ІГХ дослідження між двома групами тканин виявлено, що у тканині ІПРМЗ першої групи його показники були вищими за ті, що отримані в групі порівняння. Це не є випадковістю, адже згідно літературних даних, підвищене надходження ВМ до організму стимулює продукцію захисних ферментів, в якості яких виступають саме шаперони [273].

Наявність зв'язку між експресією hsp90 $\alpha$  та запальною інфільтрацією в пухлинному оточенні ( $r=0,52$ ) є індикатором захисної функції неопластичних клітин на дію продуктів запалення, що виникає, як було показано нашими дослідженнями, під дією ВМ та контакті ракових клітин з імуніцитами [273]. Це призводить до зростання опору пухлинних клітин до несприятливого впливу мікрооточення. При цьому виникає перехресна резистентність клітин до інгібуючих впливів як макроорганізму, так і терапевтичних засобів [274,275]. Hsp90, впливаючи на ER та PR, з одного боку зміцнює їх структуру, з іншого боку, регулює діяльність білків Akt і NF- $\kappa$ B, які залучені в процес інгібуючого впливу на транскрипцію гену ERS, кодуючого ER [282,364]. Він перешкоджає переходу рецептора в активний конформаційний стан [215]. Шаперон 90 сприяє активації антиапоптичних білків (bcl-2) і блокує білок Araf-1, який відповідальний за активацію внутрішнього апоптозного шляху. Таким чином, зміцнюється розвиток резистентності ракових клітин перед їх запрограмованою загибеллю [365]. Негативний вплив hsp90 реалізується також через підтримку конформаційного дозрівання і репарації таких білків як mt p53, ангіогенний фактора HIF-1 $\alpha$ , VEGF, MMP1 та інші [276-279,365].

Постійна присутність шаперону у випадках HER2/neu позитивних варіантів ІПРМЗ підтверджує його участь в пухлинній прогресії РМЗ. Hsp90 $\alpha$  стабілізує HER2/neu і модулює їх ефект [367]. Він стимулює опір РМЗ до

анти-HER2/neu спрямованих препаратів [368]. Це може пояснити той факт, чому ампліфікація ERBB2 гена не завжди супроводжується експресією HER2/neu, що може бути пов'язано з відсутністю hsp90 $\alpha$  [367,368]. На рис. 4.6 зображена загальна схема впливу hsp90 на морфогенез РМЗ.

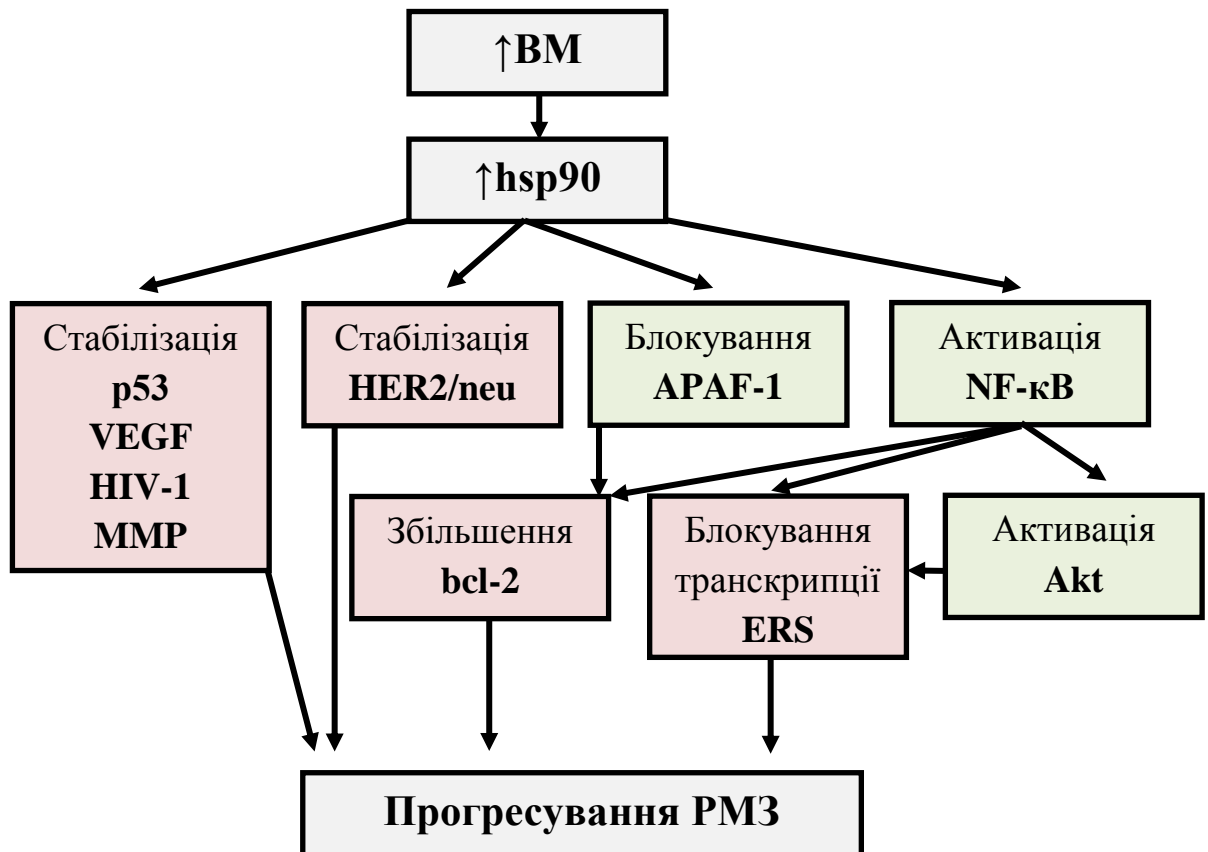


Рис. 4.6. Загальна схема впливу hsp90 на морфогенез РМЗ.

Виходячи з цього збільшення кількості hsp90 в умовах зростаючої кількості ВМ у пухлинній тканині, оксидазного стресу і запалення призводить до збільшення опору пухлинних клітин і допомагає функціонуванню прогностично несприятливих рецепторів у тканині ПРМЗ та прогресуванню неопластичного процесу.

Згідно результатів нашої роботи, перебіг пухлинного процесу у 44% випадків супроводжувався наявністю імунної реакції в пухлинному просторі, яка корелювала з вмістом ВМ у пухлинній тканині. Без сумніву, імунна система в макроорганізмі виступає фактором агресії по відношенню до чужорідних агентів, якими виступають пухлинні клітини в МЗ, яка з одного

боку обмежує поширення неопластичного процесу, а з іншого проявляє цитотоксичну активність по відношенню до фенотипово-чужорідних ракових клітин [74,75]. Але при постійному контакті імуніцитів з неопластичними клітинами лейкоцити впливають на перебіг ППМЗ у вигляді негативного фактору, підвищуючи проліферативну активність клітин, їх здатність до розповсюдження, синтезу значної кількості біологічно-активних речовин [76].

Як показують дані нашого дослідження, якісний склад лейкоцитарного інфільтрату дуже варіабельний у кожному окремому випадку. Залежить це перш за все від кількості В та Т лімфоцитів, серед яких знаходиться значна кількість гранулоцитарних лейкоцитів та макрофагів. Ці клітини перебувають у різних варіантах у складі імунного інфільтрату, але зв'язку між типом лейкоцитарного інфільтрату та експресією рецепторів тканиною ППМЗ не виявлено. Зростання інтенсивності інфільтрації залежало в більшості випадків від ступеню атипії неопластичних клітин, що говорить про зростання імуногенної активності при підвищенні анаплазії пухлинних клітин, які стають все більш чужорідними для макроорганізму. Наявність імунної відповіді на відкладання солей кальцію у пухлинному полі РМЗ є індикатором реакції організму на чужорідний компонент тканини МЗ [339,340].

Лейкоцити розташовувались як у вигляді скупчень, так і серед пухлинних клітин. Наприклад, макрофаги, утворюючи вирости в мембрані, інколи огортали пухлинні клітини, що говорить про їх тісний контакт з ними. В процесі цього контакту відбувається активація обох ланок імунітету: гуморального і клітинного. Так, при взаємодії макрофагів з пухлинними клітинами вони, по-перше, приймають участь у їх фагоцитозі, частково знешкоджуючи ракові клітини, по-друге, за рахунок антигенпрезентуючої функції представляють їх Т хелперам, які є «диригентами» імунної відповіді [369,370]. Макрофаги за рахунок секреції цитокінів, в тому числі ІЛ-1, та активації Th2 і В лімфоцитів запускають гуморальну ланку імунітету, а через

стимуляцію Th1 – клітинну ланку. У підсумку в результаті наявності ІЛ-1 активується NF-κB, а за рахунок утворення продуктів цитотоксичної реакції – hsp90, які стимулюють прогресування РМЗ [79,102].

Наявність кореляційного зв'язку між зростанням кількості В-лімфоцитів в імунному інфільтраті та зниженням експресії ER є індикатором інгібуючого впливу гуморальної імунної відповіді на експресію рецепторів до стероїдних гормонів. Ми пропонуємо розглядати цей механізм наступним чином (рис. 4.7).

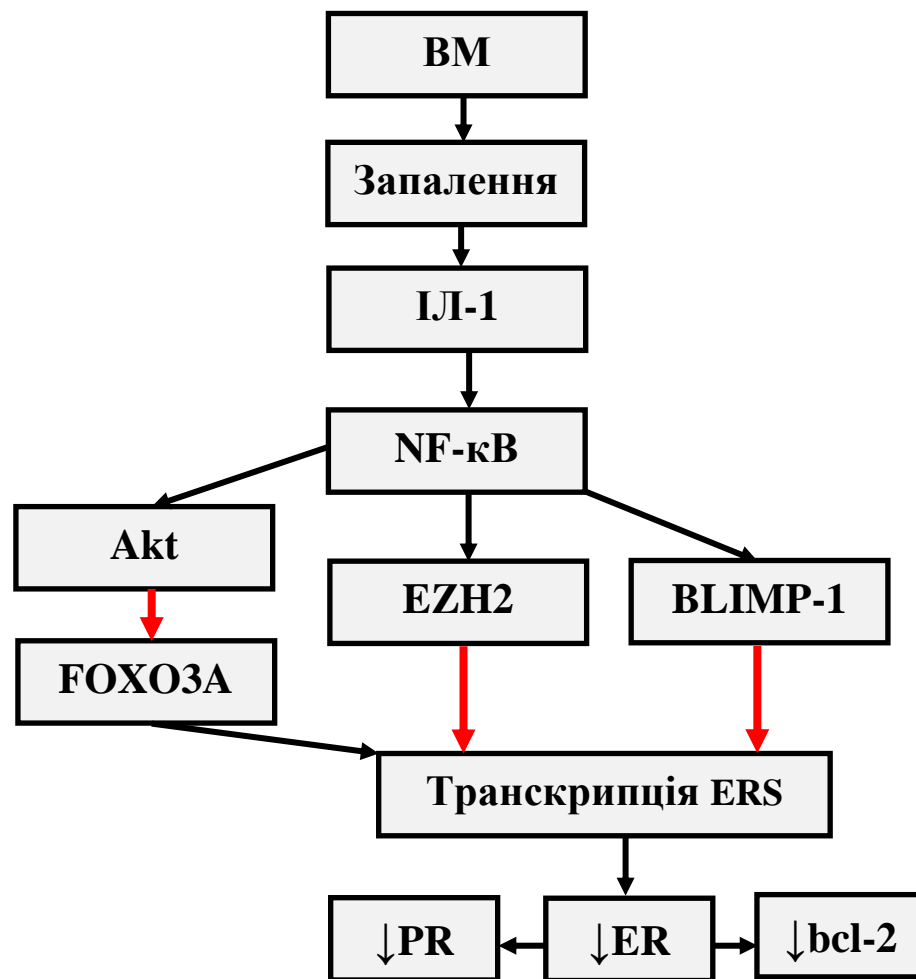


Рис. 4.7. Схема впливу VM та ІЛ-1 на транскрипцію гену, який кодує ER.

Червона стрілка показує пригнічення процесу.

Під впливом ІЛ-1 відбувається перехід NF-κB у активну форму, в результаті фосфорилування інгібуючого білка ІκB. NF-κB стимулює протеїнкіназу В, також відому як Akt, яка інгібує активність

транскрипційного фактору FOXO3A, який має стимулюючий вплив на транскрипцію ERS [80]. Також NF-κB залучений у процесі активування білків EZH2 та BLIMP-1, які пригнічують зчитування інформації з гену, який кодує естрогенові рецептори [81,82]. Таким чином, інгібуючи активатори транскрипції (FOXO3A) та активуючи її інгібітори (EZH2 та BLIMP-1), відбувається пригнічення транскрипції ERS.

Слід нагадати, що білки Akt та NF-κB залучені також у процесі регулювання активності антиапоптичного білка bcl-2. З іншої сторони відсутність ER призводить до пригнічення транскрипції гену Bcl-2, який є естроген залежним геном. Тієї ж участі зазнають і PR.

Ми вважаємо, що зростання рівня запальної інфільтрації, у разі наявності гіперестрогенії [371], в інтактній тканині є захисним механізмом, позбавляючи клітини зловісного впливу естрадіолу, який виступає етіологічним фактором при гіперестрогенії [25,26], зменшуючи кількість ER. Але при неопластичній трансформації це виступає фактором прогресування ІПРМЗ та зменшення чутливості до терапії з подальшими впливаючими наслідками.

Наявність гранулоцитарних лейкоцитів в імунному інфільтраті можна пояснити їхньою участю у процесі фагоцитозу як некротизованої тканини, так і продуктів розпаду, які виникають при взаємодії Т-кілерів (активуються Th1) з пухлинними клітинами. Функція макрофагів у перебігу неопластичного процесу також багатогранна. Окрім вищезазначених механізмів впливу на пухлинний процес вони, так звані макрофаги 2-го типу (макрофаги асоційовані з пухлиною), приймають участь у безпосередньому впливі на канцерогенез: підтримують ріст пухлини, секретуючи ростові фактори і цитокіни (TGFβ, EGF, CXCL8, CXCL12); підтримують ангіогенез та міграційну спроможність ракових клітин (синтез MMP, VEGF, трансглутаміни); подавляють цитотоксичний протипухлинний імунітет (синтез TGFβ, IL-10, CCL17, CCL 18, CCL 22) [372].

Загальна схема впливу імунної системи на пухлинну клітину РМЗ зображена на рис. 4.8.

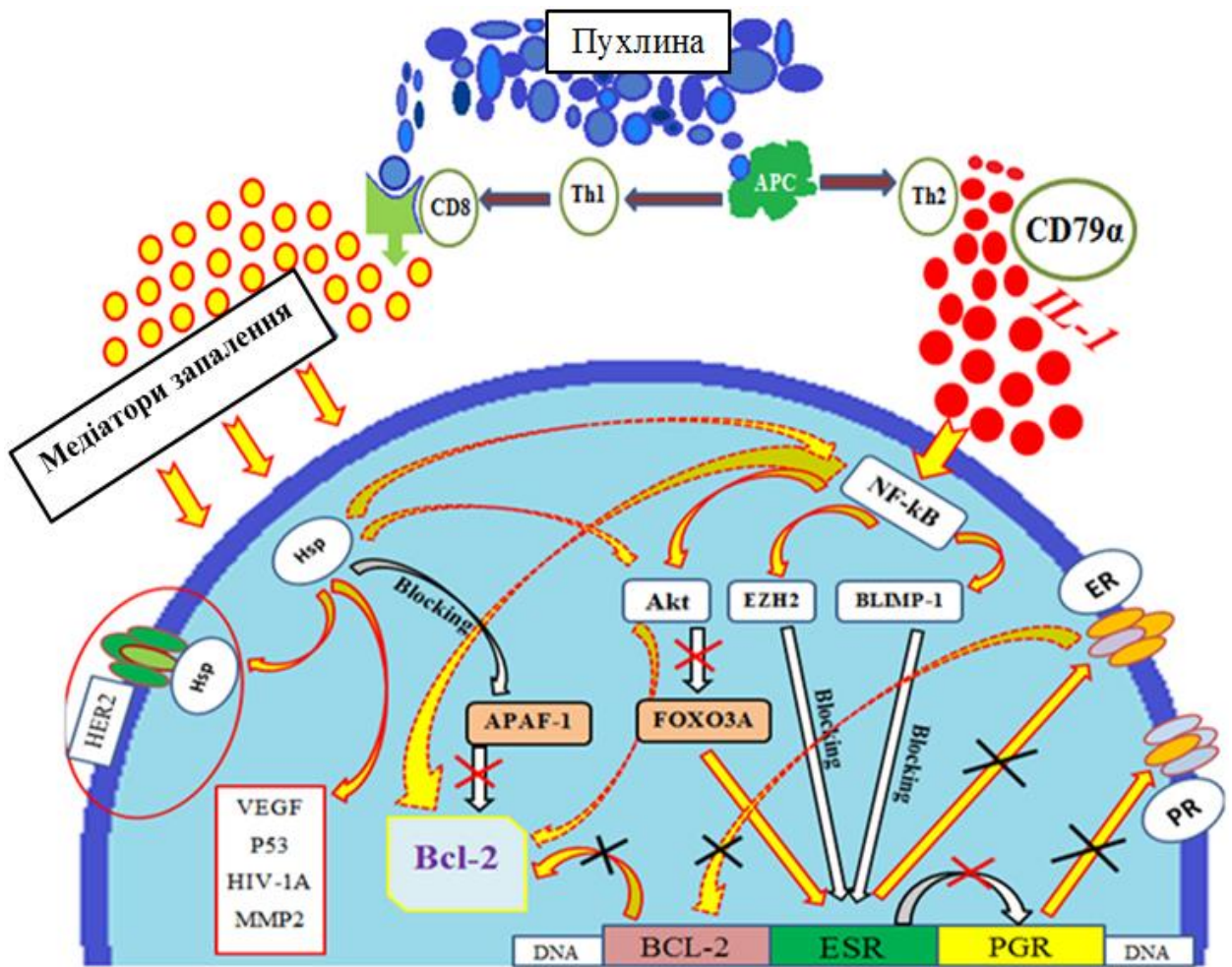


Рис. 4.8. Вплив запальної інфільтрації на пухлинні клітини.

Отже, як показують результати нашого дослідження наявність запальної інфільтрації, у виникненні якої приймають участь і ВМ, та її якісний склад через проміжні регуляторні системи клітини впливають на зменшення кількості прогностично-сприятливих та зростання прогностично-несприятливих рецепторів у тканині ШРМЗ.

Епігенетичні зміни ДНК чинять як блокуючий, так і активуючий вплив на гени, які кодують життєво-необхідні білки для клітини [321,322,325,327]. Один з таких варіантів змін, а саме рівень загального метилювання ДНК, ми вивчили за допомогою інфрачервоної спектроскопії. Наявність різного

ступеню коливання  $-CH_3$  групи, яке відбувається у діапазоні коливання азотистих основ ( $4000-2000\text{cm}^{-1}$ ), говорить про різний ступінь патологічного метилювання аденіну, гуаніну, цитозину або додаткового приєднання  $-CH_3$  групи до тиміну. Про дестабілізацію генетичного матеріалу під дією екзогенних факторів повідомлялося і раніше [373]. Воно показувало на різницю між показниками коливання спектру інтактної та пухлинної тканини МЗ. Ми ж спрямували наші дослідження на встановлення рівня метилювання ДНК та його зв'язку з показниками хімічного аналізу неопластичної тканини, даними експресії прогностичних рецепторів. Як видно з результатів нашої роботи ДНК тканини ППРМЗ має різний ступінь приєднання  $-CH_3$  групи до азотистих основ. Наявність кореляційного зв'язку між цими показниками та кількістю ВМ, виявлених у тканині при спектрофотометрії, вказує на екзогенну природу епігенетичних змін ДНК. Цей факт не є випадковістю, адже ВМ залучені у більшість внутрішньоклітинних процесів, в тому числі і перенесення електронів і активних груп ( $CH_3$ , O, S) [94,195,196,198,199].

Дані ІГХ дослідження показують, що рівень метилювання ДНК позитивно корелює з рівнем експресії білка p53, що опосередковано підтверджує активуючий вплив приєднаної  $-CH_3$  групи на транскрипцію гену P53 [325]. Отже, екзогенне надходження СВМ до організму призводить до осадження останніх у пухлинній тканині і метилювання ДНК, яке знаходить своє відображення на експресії прогностично-несприятливих рецепторів p53. Але і тут макроорганізм не залишається наодинці з цією проблемою. За рахунок підвищеної кількості деметилювального ензиму MGMT відбувається зняття метильних груп з ДНК пухлинної тканини [302,303]. Розпізнавальна послідовність протеїну з'єднується з пошкодженою нуклеїновою кислотою і забирає алкільний залишок [294]. Це іноді відіграє негативну роль, у випадку використання хіміопрепаратів, які як раз направлені на приєднання алкільної групи до ДНК і запуску таким чином апоптозу ракових клітин [292].

Наявність кореляційного зв'язку між рівнем метилювання ДНК та ступенем експресії MGMT вказує на послідовність подій у разі надходження ВМ до пухлинної тканини. Останні, викликаючи надмірне патологічне метилювання ДНК, стимулюють активацію репаративних систем, якою виступає білок MGMT, котрий необоротно усуває приєднану  $-CH_3$  групу з азотистих основ (рис. 4.9).

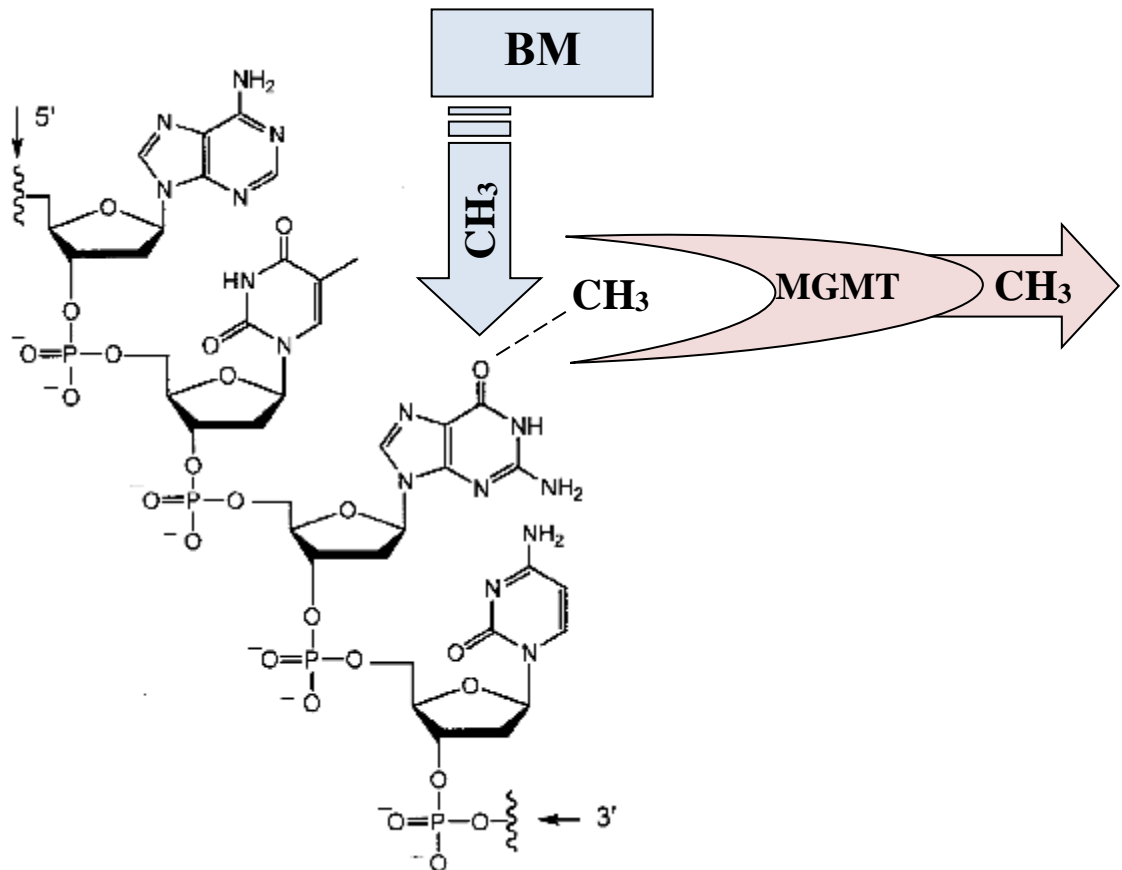


Рис. 4.9. Схема метилювального ефекту ВМ на ДНК клітини і деметилювальної дія MGMT.

Як показують результати нашого дослідження при зростанні кількості MGMT знижується рівень експресії ER та PR. Пояснюємо це тим, що утворена в результаті взаємодії з  $-CH_3$  групою MGMT інактивується і вступає у взаємозв'язок з рецепторами до стероїдних гормонів, пригнічуючи їх функцію [305]. При зростанні кількості приєднаних метильних груп,

збільшується кількість MGMT, відповідно, знижується чутливість до антигормональних препаратів клітин ІПРМЗ.

Ще однією особливістю MGMT є те, що її кількість зростає у міру збільшення рівня фрагментації ДНК. Ці ж дані отримані і в наших дослідженнях, що говорить про синхронність регуляторних процесів та тісний взаємозв'язок між всіма внутрішньоклітинними процесами. Як можна бачити з даних нашого дослідження, має місце позитивний кореляційний зв'язок між рівнем фрагментації ДНК та накопиченням у тканині ІПРМЗ ВМ. Одночасно з підвищенням рівня фрагментації ДНК знижується чутливість тканини до антигормональних препаратів, про що говорить негативний зв'язок між фрагментацією ДНК та наявністю ER. Отже дестабілізація генетичного матеріалу, у вигляді її фрагментації, призводить до прогресування пухлинного процесу. Цей факт також підтверджується зростанням рівня експресії білка Ki-67 ( $r=0,62$ ), що є маркером проліферативної активності клітин, та сильним кореляційним зв'язком між рівнем білка p53 ( $r=0,77$ ) та ступенем фрагментації ДНК, що говорить про взаємозв'язок між рівнем мітотичної активності ракових клітин, порушенням їхнього проапоптичного потенціалу та рівнем дестабілізації геному. Враховуючи отримані результати можна стверджувати, що вплив ВМ на фрагментацію ДНК реалізується через такі непрямі ланки життєдіяльності ракових клітин, як посилення мітотичної активності та синтез mt p53 (рис.4.4).

Звісно, дестабілізуючий вплив СВМ на ДНК може реалізовуватись і через прямий негативний вплив на генетичний матеріал, викликаючи утворення одно- та двониткових розривів, як через вплив на геном продуктів ПОЛ та АФК, які утворюються за умови надлишку ВМ в клітині, так і через прямий контакт ВМ з молекулою ДНК [100,101,179].

Узагальнюючи всі отримані результати можна стверджувати, що при підвищеному надходженні СВМ до організму жінок відбувається процес відкладання іонів ВМ у тканині МЗ, що може слугувати додатковим

«кофактором» розвитку неопластичного процесу. У процесі морфогенезу ІПРМЗ ВМ стимулюють проліферативну активність клітин, їх дедиференціювання, міграційну спроможність, дестабілізацію генетичного матеріалу та наявність інших (патологічна мінералізація, запалення) несприятливих прогностичних факторів онкологічного процесу, змінюють якісні характеристики пухлинної тканини і фенотипічні особливості ракових клітин, пригнічують експресію або безпосередньо, або опосередковано, рецепторів до естрогену та прогестерону у тканині ІПРМЗ, що призводить до прогресування злякисного процесу та подальшого розповсюдження по організму.

Наявність більш тісних зв'язків між показниками експресії рецепторів у жінок, які мешкають у відносно «екологічно-чистих» районах Сумської області, над тими, що отримані в першій групі, говорить про менший вплив на них ВМ, які змінюють особливості взаємозв'язку між внутрішньоклітинними білками.

Підсумовуючи вплив ВМ на ER, як найбільш прогностично-важливі рецептори у тканині ІПРМЗ, можна стверджувати, що ВМ через ряд патогенетичних шляхів пригнічують як транскрипцію складових частин ER так і їх функціонування (рис. 4.10).

Зменшення кількості ER виникає при зростанні кількості ВМ у пухлинній тканині, які реалізують інгібуючий вплив через наступні механізми:

- метилювання ДНК та активацію MGMT;
- запалення та пригнічення транскрипції ERS;
- виснаження рецепторів естрогену;
- втрату рецепторів в процесі фенотипічного спрощення.

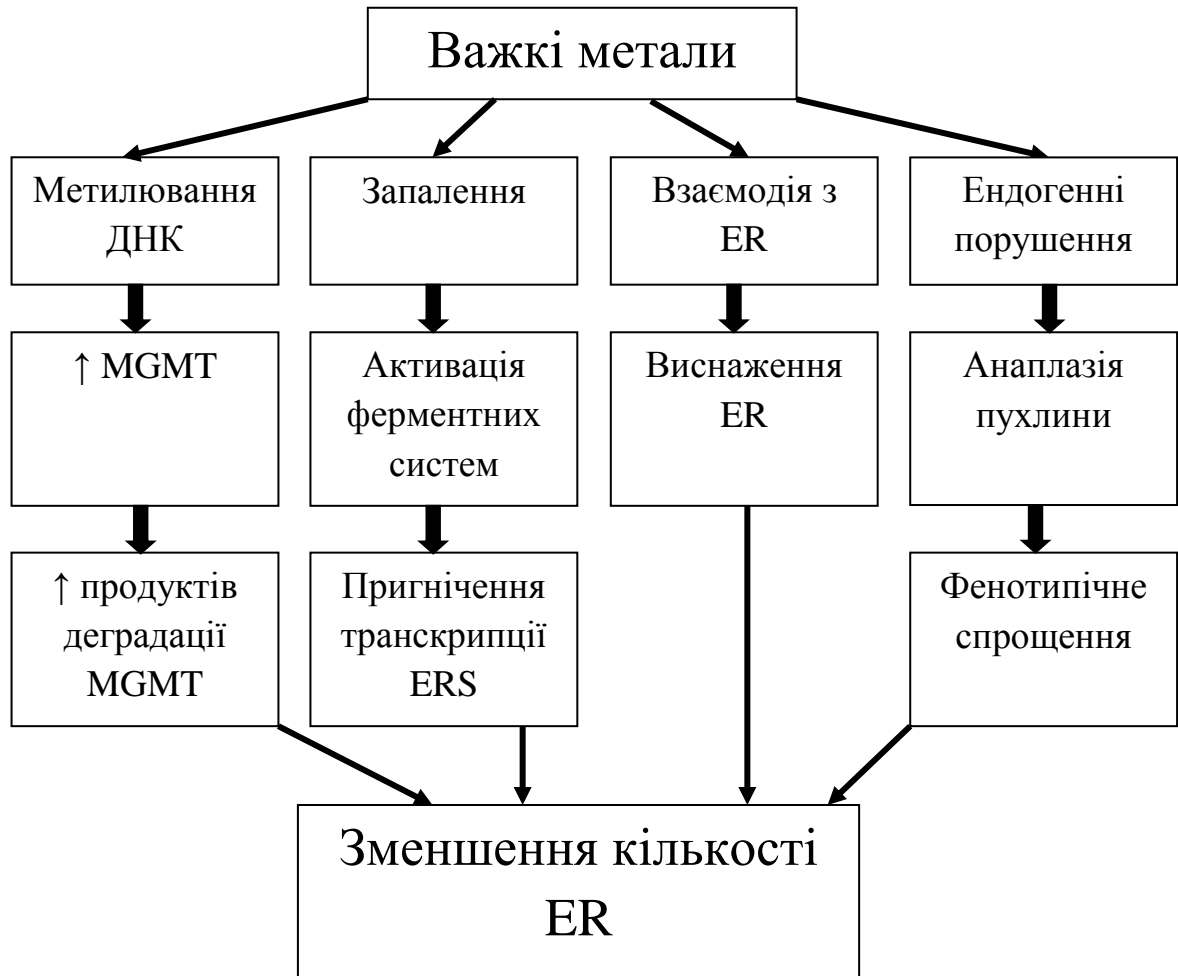


Рис. 4.10. Схема впливу ВМ на ER.

Отже, надходження ВМ до пухлинної тканини МЗ призводить до їх акумуляції, що знаходить своє відображення на перебігу злоякісного процесу. Вони, впливаючи на морфологічні особливості тканини ППРМЗ, стимулюють прогресування неоплазій, надаючи їм більш агресивних якостей, від яких залежить як чутливість пухлин до терапії, так і прогноз перебігу захворювань.

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведене теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, яка стосується покращення якості діагностики раку молочної залози шляхом виявлення особливостей морфогенезу інфільтративного протокового раку молочної залози в умовах підвищеного надходження до організму солей важких металів, з'ясування патогенетичних особливостей канцерогенезу за умови накопичення важких металів у пухлинній тканині, що дозволило прийти до наступних висновків.

1. За період з 2004 по 2014 роки в Сумській області відмічено зростання захворюваності на рак молочної залози з 39 до 46 % відповідно. Жінки, які проживають в «екологічно-забруднених» районах Сумської області, майже у два рази частіше хворіють на рак молочної залози, ніж жінки, які мешкають у відносно «екологічно-чистих» районах. В обох групах районів переважає інфільтративний протоковий рак молочної залози (91 %). В «екологічно-забруднених» районах переважають пухлини з низьким ступенем диференціювання (G2 і G3).

2. За умов забруднення довкілля солями важких металів у тканині інфільтративного протокового раку молочної залози зростає вміст іонів важких металів ( $p < 0,05$ ), який у другій групі на 22,4 % менше, ніж у першій, що зумовлює більш агресивний перебіг злоякісного процесу. Вміст Fe у пухлинній тканині в «екологічно-забруднених» районах на 24 % більший, ніж в «екологічно-чистих» районах ( $p = 0,001$ ), вміст Cu – на 15,4 % ( $p = 0,002$ ), Cr – на 16,8 % ( $p = 0,016$ ), Zn – на 13,8 % ( $p = 0,005$ ), Pb – на 11,1 % ( $p = 0,026$ ) та Ni – на 9,3 % ( $p = 0,011$ ). Дані, отримані при енерго-дисперсійній спектроскопії, підтверджують результати елементного складу неопластичної тканини. Вміст важких металів більш високий у паренхіматозному компоненті пухлини у порівнянні зі стромою ( $p < 0,05$ ).

3. Підвищення кількості важких металів у неопластичній тканині молочної залози супроводжується зниженням ступеня диференціювання пухлини, зростанням рівня патологічної біомінералізації на 19 % та імунної запальної інфільтрації ( $p < 0,05$ ), що виступають факторами прогресування злякисного процесу.

4. Виявлено позитивний кореляційний зв'язок між накопиченням важких металів у тканині інфільтративного протокового раку молочної залози та експресією прогностично-несприятливих рецепторів пухлинною тканиною: p53 ( $r = 0,31$ ,  $p < 0,01$ ), Ki-67 ( $r = 0,51$ ,  $p < 0,01$ ), HER2/neu ( $r = 0,36$ ,  $p < 0,05$ ), MGMT ( $r = 0,33$ ,  $p < 0,05$ ), MMP1 ( $r = 0,61$ ,  $p < 0,01$ ), VEGF ( $r = 0,59$ ,  $p < 0,01$ ), OPN ( $r = 0,43$ ,  $p < 0,01$ ), hsp90 ( $r = 0,27$ ,  $p < 0,05$ ); та негативний кореляційний зв'язок з прогностично-сприятливими рецепторами пухлинної тканини: ER ( $r = -0,7$ ,  $p < 0,01$ ), PR ( $r = -0,59$ ,  $p < 0,01$ ) та Е-кадгерину ( $r = -0,32$ ,  $p < 0,05$ ), що вказує на негативний вплив солей важких металів на рецепторний фенотип неопластичних клітин раку молочної залози. Також виявлено, що у пухлинній тканині жінок з групи «екологічно-забруднених» районів вищі показники ( $p < 0,05$ ) експресії hsp90 $\alpha$  та менший рівень експресії рецепторів до стероїдних гормонів ( $p < 0,05$ ), ніж у матеріалі від жінок, які проживають у незабруднених регіонах.

5. Підвищене накопичення Fe, Zn, Cu, Cr, Ni та Pb у пухлинній тканині впливає на генетичний матеріал клітин інфільтративного протокового раку молочної залози, що проявляються у блокуванні транскрипції рецепторів, патологічному метилюванні ДНК та прогресуючому зростанні його фрагментації ( $p < 0,05$ ), що негативно відображається на перебігу злякисного процесу.

6. Важкі метали, накопичуючись у пухлинній тканині молочної залози, через внутрішньоклітинні посередники стимулюють процеси патологічної біомінералізації та васкуляризації, стабілізують прогностично-несприятливі протеїни, дестабілізують генетичний матеріал та блокують активність прогностично-сприятливих рецепторів, що призводить до прогресування канцерогенезу в молочній залозі.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Жінки, які мешкають чи працюють на екологічно-забруднених територіях або мають проблеми з порушенням обміну мікроелементів, потребують поглибленого скринінгу і більш частішої перевірки на предмет раннього виявлення передпухлинних процесів та раку молочної залози. При їх лікуванні необхідно звертати увагу на можливість накопичення у пухлинній тканині молочної залози іонів важких металів, які можуть пролонговано стимулювати прогресування злоякісного процесу.

2. Виявлену патологічну біомінералізацію та інтенсивну запальну інфільтрацію навколо інфільтративного протокового раку молочної залози при гістологічному дослідженні вважати прогностично-несприятливим фактором перебігу неопластичного процесу.

3. Для коректної оцінки перебігу та прогнозу інфільтративного протокового раку молочної залози у хворих, які мешкають в «екологічно-забруднених» регіонах, доцільно при імуногістохімічному дослідженні, окрім експресії рецепторів до естрогену, прогестерону, епідермального фактору росту, p53 та Ki-67, звертати увагу на необхідність визначення інших прогностично-важливих рецепторів у пухлинній тканині молочної залози (bcl-2, hsp90, VEGF).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Зотов А. С. Мастопатии и рак молочной железы / А. С. Зотов, Е. О. Белик. – М: МЕДпресс-информ, 2005. – 112 с.
2. WHO classification of tumours of the breast. IARC/World health organization classification of tumours / [S. R. Lakhani, I. O. Ellis, S. J. Schnitt at all.] – Lyon, France: WHO Press, 2012.
3. Tavassoli F. A. 3. Tumor of the Breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumours / F. A. Tavassoli, P. Devilee. – Lyon: IARC Press, 2003. – 432 p.
4. Семиглазов В. Ф. Неинвазивные и инвазивные опухоли молочной железы / В. Ф. Семиглазов, В. В. Семиглазов, А. Е. Клецель. – СПб, 2009. – 349 с.
5. Гаргін В. В. Патологоанатомічна діагностика передракових процесів молочної залози / В. В. Гаргін. // Медицина сьогодні і завтра. – 2015. – №1. – С. 15-18.
6. Important increase of invasive lobular breast cancer incidence in Geneva, Switzerland / [H. M. Verkooijen, G. Fioretta, G. Vlastos at all.]. // Int J Cancer. – 2003. – №104. – P. 778-81.
7. Breast cancer before age 40 years / [C. K. Anders, R. Johnson, J. Litton at all.]. // Semin Oncol. – 2009. – №3. – P. 237-249.
8. Jensen E. V. The contribution of "alternative approaches" to understanding steroid hormone action / E. V. Jensen. // Mol Endocrinol. – 2005. – №6. – P. 1439-1442.
9. Clinical outcomes of breast cancer in carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations / [G. Rennert, S. Bisland-Naggan, O. Barnett-Griness at all.]. // Narod N Engl J Med. – 2007. – №2. – P. 115-123.
10. Global cancer statistics / [D.M. Parkin, F. Bray, J. Ferlay at all.]. // CA Cancer J Clin. – 2005. – №2. – P.74-108.

11. Наказ № 887 від 30.11.2009 Про затвердження медичних рекомендацій «Біопротекція розвитку екозалежної патології у критичних верст населення індустріальних міст» Міністерство охорони здоров'я України.

12. Рустембекова С. А. Микроэлементозы и факторы экологического риска: для практикующих врачей / С. А. Рустембекова, Т. А. Барабошкина. – М.: Логос, 2006. – 512 с.

13. Макро- та мікроелементи (обмін, патологія та методи визначення): монографія / [М. В. Погорелов, В. І. Бумейстер, Г. Ф. Ткач та ін.]. – Суми: Вид-во СумДУ, 2010. – 147 с.

14. Доповідь про стан навколишнього природного середовища в Сумській області у 2009 році. — Суми : ПКП "Еллада S", 2010. — 84 с.

15. Романюк А. М. Морфологічні зміни в тонкій кишці в умовах гострої дії на організм солей важких металів / А. М. Романюк, В. В. Кравець. // Вісник СумДУ. Серія Медицина. – 2007. – №1. – С. 39-42.

16. Periodontal bone response under the influence of Cr(VI) / E.Kuzenko, A. Romaniuk, A. Korobchanskaya, L. Karpenko. // Osteologický bulletin. – 2014. – №1. – P. 25-31.

17. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells / [M.B. Martin, R. Reiter, T. Pham at all.]. // Endocrinology. – 2003. – №6. – P. 2425-36.

18. Dietary Fat Intake and Development of Specific Breast Cancer Subtypes / [S. Sieri, P. Chiodini, C. Agnoli at all.]. // J Natl Cancer Inst. – 2014. – №5. – P. 1-6.

19. Wu Y. Physical activity and risk of breast cancer: a meta-analysis of prospective studies / Y. Wu, D. Zhang, S. Kang. // Breast Cancer Res Treat. – 2013. – №137. – P. 869-882.

20. Gudmundsdottir K. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability / K. Gudmundsdottir, A. Ashworth. // Oncogene. – 2006. – №25. – P. 5864-5874.

21. Нейштадт Э. Л. Патология молочной железы / Э. Л. Нейштадт, О. А. Воробьева. – СПб: Фолиант, 2003. – 197 с.
22. Intake of fruits, and vegetables in relation to breast cancer risk by hormone receptor status / [J. Lissowska, M. M. Gaudet, L.A. Brinton at all.]. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2008. – №1. – P. 113-117.
23. Kershaw E. E. Adipose tissue as an endocrine organ / E. E. Kershaw, J. S. Flier. // *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* – 2004. – №6. – P. 2548-2556.
24. Cellular models for understanding adipogenesis, adipose dysfunction, and obesity / [A. Armani, C. Mammi, V. Marzolla at all.]. // *Journal of Cellular Biochemistry.* – 2010. – №3. – P. 564-572.
25. Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast-cancer risk among postmenopausal women / [S. A. Missmer, A. H. Eliassen, R. L. Barbieri at all.]. // *J Natl Cancer Inst.* -2004. – V.96. – P. 1856-1865.
26. Suba Z. Triple-negative breast cancer risk in women is defined by the defect of estrogen signaling: preventive and therapeutic implications / Z. Suba. // *OncoTargets Ther.* – 2014. – №7. – P. 147-164.
27. Захарцева Л. М. Морфологическая диагностика рака молочной железы / Л. М. Захарцева, М. В. Дятел, А. В. Григорчук. – К: МОРИОН, 2007. – 72 с.
28. Nonfounder BRCA1 mutations in Russian breast cancer patients / [A. G. Iyevleva, E. N. Suspitsin, K. Kroeze at all.]. // *Cancer Lett.* – 2010. – V.298. – P. 258-263.
29. Apostolou P. Hereditary Breast Cancer: The Era of New susceptibility Genes / P. Apostolou, F. Fostira. // *BioMed Research International.* – 2013. – №6. – P. 77-96.
30. Ruddy K. J. Male breast cancer: risk factors, biology, diagnosis, treatment, and survivorship / K. J. Ruddy, E. P. Winer. // *Annals of Oncology.* – 2013. – V.24. – P. 1434-1443.

31. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort / [S. Masciari, D. A. Dillon, M. Rath at all.]. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2012. – V.133. – P. 1125-1130.
32. Lifetime Cancer Risks in Individuals with Germline PTEN Mutations / M. H. Tan, J. L. Mester, J. Ngeow, L. A. Rybicki. // *Clin Cancer Res.* – 2012. – V.18. – P. 400-410.
33. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2 / [A. C. Antoniou, S. Casadei, T. Heikkinen at all.]. // *N Engl J Med.* – 2014. – V.371. – P. 497-506.
34. Risk of Breast Cancer in Women With a CHEK2 Mutation With and Without a Family History of Breast Cancer / C. Cybulski, D. Wokolorzyk, A. Jakubowska at all.]. // *J Clin Oncol.* – 2011. – V.29. – P. 3747-3752.
35. Salmons B. Revisiting a role for a mammary tumor retrovirus in human breast cancer / B. Salmons, W. H. Gunzburg. // *International Journal of Cancer.* – №7. – P. 1530-1535.
36. Salmons B. Recent developments linking retroviruses to human breast cancer: infectious agent, enemy within or both? / B. Salmons, J. S. Lawson, W. H. Gunzburg. // *Journal of General Virology.* – 2014. – V.95. – P. 2589-2593.
37. Poole C. The darkness at the end of the tunnel: summary and evaluation of an international symposium on light, endocrine systems and cancer / C. Poole. // *Neuroendocrinol Lett Suppl.* – 2002. – №2. – P. 71-8.
38. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study / [E. S. Schernhammer, F. Laden, F. E. Speizer at all.]. // *J Natl Cancer Inst.* – 2001. – V.93. – P. 1563-8.
39. Recent diet and breast cancer risk: the California Teachers Study (USA) / [P. L. Horn-Ross, K. J. Hoggatt, D. W. West at all.]. // *Cancer Causes Control.* – 2002. – V.13. – P. 407-15.
40. John E. M. Radiation and other environmental exposures and breast cancer / E. M. John, J. L. Kelsey. // *Epidemiologic Reviews.* – 1993. – V.15. – P. 157-162.

41. Parkin D. M. Use of statistics to assess the global burden of breast cancer / D. M. Parkin, L. M. Fernandez. // *Breast Journal*. – 2006. – V.12 (1). – P. 70-80.
42. Sasco A. J. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? / A. J. Sasco. // *Endocrinology*. – 2001. – №10. – P. 3595-602.
43. Stoica A. Effects of arsenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells / A. Stoica, E. Pentecost, M. B. Martin. // *Endocrinology*. – 2000. – №10. – P. 3595-602.
44. Stoica A. Activation of estrogen receptor-alpha by the heavy metal cadmium. / A. Stoica, B. S. Katzenellenbogen, M. B. Martin. // *Mol Endocrinol*. – 2006. – V.14. – P. 545-553.
45. Cadmium mimics the in vivo effects of estrogen in the uterus and mammary gland / [M. D. Johnson, N. Kenney, A. Stoica at all.]. // *Nat Med*. – 2003. – №9. – P. 1081-1084.
46. Hankinson S. E. Endogenous estrogen, testosterone and progesterone levels in relation to breast cancer risk / S. E. Hankinson, A. H. Eliassen. // *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2007. – V.106. – P. 24-30.
47. Hentze M. W. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism / M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, B. Galy, C. Camaschella. // *Cell*. – 2010. – V.142. – P. 24-38.
48. Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. / [Z. K. Pinnix, L. D. Miller, W. Wang at all.]. // *Sci Transl Med*. – 2010. – №2. – P. 43-56.
49. Hassouneh B. Tetrathiomolybdate promotes tumor necrosis and prevents distant metastases by suppressing angiogenesis in head and neck cancer / B. Hassouneh. // *Mol Cancer Ther*. – 2007. – №6. – P. 1039-1046.
50. Phase I study of copper-binding agent ATN-224 in patients with advanced solid tumors / [S. A. Lowndes, A. Adams, A. Timms at all.]. // *Clin Cancer Res*. – 2008. – №14. – P. 7526-34.

51. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells / N. Kagara, N. Tanaka, S. Noguchi, T. Hirano. // *Cancer Sci.* – 2007. – V.98. – P. 692-697.

52. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells / [M. Hashemi, S. Ghavami, M. Eshraghi at all.]. // *Eur J Pharmacol.* – 2007. – V.557. – P. 9-19.

53. Shen H. Concordant correlation of LIV-1 and E-cadherin expression in human breast cancer cell MCF-7 / H. Shen, H. Qin, J. Guo // *Mol Biol Reprod.* – 2009. – V.36. – P. 653-659.

54. Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy / [S. Amat, F. Penault-Llorca, H. Cure at all.]. // *Int. J. Oncol.* – 2002. – №4. – P. 791-796.

55. Invasive carcinoma of no special type. WHO Classification of Tumours of the Breast / S. R. Lakhani, I. O. Ellis, S. J. Schnitt, P. H. Tan. – Lyon, 2012. – 34-38 p.

56. Ellis I. O. WHO Classification of Tumours of the Breast / S. R. Lakhani, I. O. Ellis, S. J. Schnitt. – Lyon, 2012. – 19-20 p.

57. Weigelt B. Histological types of breast cancer: How special are they? / B. Weigelt, F. C. Geyer, J. S. Reis-Filho. // *Mol Oncol.* – 2010. -№4. – P. 192-208.

58. Decorin-mediated inhibition of cholangiocarcinoma cell growth and migration and promotion of apoptosis are associated with E-cadherin in vitro / [X. Yu, Y. Zou, Q. Li at all.]. // *Tumor Biol.* – 2014. – V.35. – P. 3103-3112.

59. Brachtel E. Molecular Pathology of the Breast / E. Brachtel. // *Surg Pathol Clinics.* – 2012. – №5. – P. 793-819.

60. Greenough R. B. Varying degrees of malignancy in cancer of cinoma of the female breast / R. B. Greenough. // *J. Cancer. Res.-* 1925.- V.9. – P. 453-463.

61. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant

chemotherapy / [S. Amat, F. Penault-Llorca, H. Cure at all.]. // *Int. J. Oncol.* -2002. – №4. – P. 791-796.

62. Elston C. W. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. / C. W. Elston, I. O. Ellis // *Histopathology.* – 1991. – V.19. – P. 403-10.

63. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / [T. Sørlie, C. Perou, R. Tibshirani at all.]. // *Proc Natl Acad Sci.* – 2001. – V.98. – P. 10869-10874.

64. Петрова С. В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека. -4-е изд., доп. И перераб. / С. В. Петрова, Н. Т. Райхлына. – Казань, 2012. – 624 p.

65. Creighton C. J. The molecular profile of luminal B breast cancer / C. J. Creighton. // *Biologics: Targets and Therapy.* – 2012. – №.6. – P. 289-297.

66. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and followup / [E. Senkus, S. Kyriakides, F. P. Penault-Llorca at all.]. // *Annals of Oncology.* – 2013. – V.24. – P. 7-23.

67. New relationships between breast microcalcifications and cancer / [R. Baker, K. D. Rogers, N. Shepherd at all.]. // *Br J Cancer.* – 2010. – №8 – P. 1034-1039.

68. Novel conformation-specific antibodies against matrix gamma-carboxyglutamic acid (Gla) protein: Undercarboxylated matrix Gla protein as marker for vascular calcification / [L. J. Schurgers, K. J. Teunissen, M. H. Knapen at all.]. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2005. – V.25. – P. 1629-1633.

69. Kuro-o M. Klotho as a regulator of oxidative stress and senescence / M. Kuro-o. // *Biol Chem.* – 2008. – V.389. – P. 233-241.

70. Microcalcifications in breast cancer: novel insights into the molecular mechanism and functional consequence of mammary mineralisation / [R. F. Cox, A. Hernandez-Santana, S. Ramdass at all.]. // *British Journal of Cancer.* – 2012. – №3. – P. 525 – 537.

71. Identifying microcalcifications in benign and malignant breast lesions by probing differences in their chemical composition using Raman spectroscopy / [A. S. Haka, K. E. Shafer-Peltier, M. Fitzmaurice at all.]. // *Cancer Res.* – 2002. – V.62. – P. 5375-5380.

72. Ignat M. The Removal of Zn<sup>2+</sup> Ions from Groundwater using Hydroxyapatite Nanoparticles / M. Ignat, M. Alexandroaei, N. C. Lungu. // *Rev. Chim.* – 2011. – №5. – P. 518-521.

73. Ichijo T. Observations on structural features and characteristics of biological apatite crystals / T. Ichijo, Y. Yamashita, T. Terashima. // *Bull Tokyo Med Dent Univ.* – 1993. – V.40. – P. 193-205.

74. Intratumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis / [C. Domschke, F. Schuetz, Y. Ge at all.]. // *Cancer Res.* – 2009. – №21. – P. 8420-8.

75. The relationship between components of tumour inflammatory cell infiltrate and clinicopathological factors and survival in patients with primary operable invasive ductal breast cancer / [Z. M. Mohammed, J. J. Going, J. Edwards at all.]. // *Br J Cancer.* – 2012. – №5. – P. 864-73.

76. Keibel A. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression / A. Keibel, V. Singh, M. C. Sharma. // *Curr. Pharm. Des.* – 2009. – №17. – P. 1949-1955.

77. Schmidt C. Immune system's Toll-like receptors have good opportunity for cancer treatment / C. Schmidt. // *J. Nat. Cancer Inst.* – 2006. – T98. – P. 574-575.

78. Leukocyte composition of human breast cancer / [B. Ruffell, A. Au, H. S. Rugo at all.]. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2011. – №8. – P. 2796-2801.

79. The interaction between ER and NF-κB in resistance to endocrine therapy / L. Sas, F. Lardon, P.B. Vermeulen, J. Hauspy. // *Breast Cancer Research.* – 2012. – V.14. – P. 212-20.

80. Belguise K. PKC $\theta$  promotes c-Rel-driven mammary tumorigenesis in mice and humans by repressing estrogen receptor  $\alpha$  synthesis / K. Belguise, G. E. Sonenshein // *J Clin Invest.* – 2007. – V.117. – P. 4009-4021.

81. Reijm E. A. Decreased expression of EZH2 is associated with upregulation of ER and favorable outcome to tamoxifen in advanced breast cancer / E. A. Reijm, M. P. Jansen, K. Ruigrok-Ritstier. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2011. – V.125. – P. 387-394.

82. RelB NF- $\kappa$ B represses estrogen receptor alpha expression via induction of the zinc finger protein Blimp1 / X. Wang, K. Belguise, C. F. O'Neill, N. Sánchez-Morgan. // *Mol Cell Biol.* – 2009. – V.29. – P. 3832-3834.

83. Кабата-Пендиас А. Микроэлементы в почвах и растениях / А. Кабата-Пендиас, Х. Пендиас. – М.: Мир, 1989. – 439 с.

84. Тронько М. Мікроелементи в ендокринології / М. Тронько, О. Щербак // *Аспекти фармакології.* – 2002. – №10. – С. 24-27.

85. Жолнин А. В. Химические элементы в окружающей среде и в организме человека / А. В. Жолнин. – Челябинск: ЧГМА, 2000. – 30 с.

86. Агаджанян Н. А. Химические элементы в среде обитания и экологический портрет человека / Н. А. Агаджанян, А. В. Скальный. – М: Изд-во КМК, 2001. – 83 с.

87. Скальный А. В. Микроэлементозы у детей: распространенность и пути коррекции / А. В. Скальный, Г. В. Яцык, Н. Д. Одинаева. – М: Изд-во КМК, 2002. – 86 с.

88. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм / [Р.С. Гильденскиольд, Ю.В. Новиков, Р.С. Хамидулин та ін.]. // *Гигиена и санитария.* – 1992. – №5-6. – С. 6-9.

89. Mammalian metallothionein in toxicology, cancer, and cancer chemotherapy / [M. Namdarghanbari, W. Wobig, S. Krezoski at all.]. // *J. Biol. Inorg. Chem.* – 2011. – №7. – P. 1087-101.

90. Sutherland D. E. The "magic numbers" of metallothionein / D. E. Sutherland, M. J. Stillman. // *Metallomics.* – 2011. – №5. – P. 444-63.

91. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism / M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, B. Galy, C. Camaschella // *Cell*. – 2010. – V.142. – P. 24-38.
92. Lutzen A. Cadmium inhibits human DNA mismatch repair in vivo / A. Lutzen, S. E. Liberti, L. J. Rasmussen. // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2004. – №1. – P. 21-5.
93. Nikolic J. Lespeflan, a bioflavonoid, and amidinotransferase interaction in mercury chloride intoxication / J. Nikolic, D. Sokolovic. // *Ren Fail*. – 2004. – №6. – P. 607-11.
94. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology / [N. Thirumoorthy, A. Shyam Sunder, K. Manisenthil Kumar at all.]. // *World J Surg Oncol*. – 2011. – №9. – P. 54.
95. Щелягина Л. А. Цинк в педиатрической практике (учебное пособие) / Л. А. Щелягина. – М., 2001. – 84 с.
96. Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах / [Ю. П. Благой, В. Л. Галкин, Г. О. Гладченко та ін.]. – Киев: Наукова думка, 1991. – 78 с.
97. De Bont R. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data / R. De Bont, N. V. Larebeke. // *Mutagenesis*. – 2004. – №3. – P. 169-85.
98. Жолнин А. В. Химические элементы в окружающей среде и в организме человека / А. В. Жолнин. – Челябинск: ЧГМА, 2000. – 30 с.
99. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms / A. Hartwig, M. Asmuss, I. Ehleben, U. Herzer. // *Environ Health Perspect*. – 2002. – №5. – P. 797-9.
100. Бабенко Г. А. Микроэлементозы человека: патогенез, профилактика, лечение / Г. А. Бабенко. // *Микроэлементы в медицине*. – 2001. – №2. – С. 2-5.

101. Антошина Е. Е. Канцерогенное действие хрома и его соединений / Е. Е. Антошина, Т. Г. Горькова. // Экспериментальная онкология. – 1992. – №2. – С. 79.
102. Воронцова Л. Л. Состояние оксидантно-антиоксидантной системы организма у больных раком гортани / Л. Л. Воронцова, В. А. Каширин. // Вісник СумДУ. – 2005. – №3. – С. 184-189.
103. Балаболкин М. И. Роль окислительного стресса в патогенезе сосудистых осложнений диабета. / М. И. Балаболкин, Е. М. Клебанова // Проблемы эндокринологии. – 2000. – №6. – С. 29-34.
104. Тронько М. Мікроелементи в ендокринології / М. Тронько, О. Щербак. // Аспекти фармакології. – 2002. – №10. – С. 24-27.
105. Состояние минерального обмена и коррекция микроэлементозов у детей дошкольного возраста в крупном промышленном центре Западной Сибири / Е. А. Вильмс, Д. В. Турчанинов, Л. А. Боярская, М. С. Турчанинова. // Педиатрия. – 2010. – №1. – С. 81-86.
106. Макро- и микроэлементы крови у пациентов пожилого и старческого возраста, страдающих ишемической болезнью сердца / [Т. М. Юрина, Т. А. Куприянова, О. И. Лямина та ін.]. // Клин мед. – 2005. – №1. – С. 20-24.
107. Eide D. J. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc / D. J. Eide. // Biochim Biophys Acta. – 2006. – V.17. – P. 711-722.
108. Overview of mammalian zinc transporters / T. Kambe, Y. Yamaguchi-Iwai, R. Sasaki, M. Nagao. // Cell Mol Life Sci. – 2004. – V.61. – P. 49-68.
109. Palmiter R. D. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers / R. D. Palmiter, L. Huang. // In: Hediger MA. – 2003. – V.447. – P. 744-751.
110. Zinc transporters 1, 2 and 4 are differentially expressed and localized in rats during pregnancy and lactation / [J. P. Liuzzi, J. A. Bobo, L. Cui at all.]. // J Nutr. – 2003. – V.133. – P. 342-351.

111. Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer / [Y. Cui, S. Vogt, N. Olson at all.]. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2007. – V.16. – P. 1682-1685.

112. Aberrant expression of zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) significantly contributes to human pancreatic cancer pathogenesis and progression / [M. Li, Y. Zhang, Z. Liu at all.]. // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – V.104. – P. 18636-18641.

113. Shen H. Concordant correlation of LIV-1 and E-cadherin expression in human breast cancer cell MCF-7 / H. Shen, H. Qin, J. Guo. // *Mol Biol Reprod.* – 2009. – V.36. – P. 653-659.

114. Genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in microarray analysis of breast biopsies / [M. A. Dressman, T. M. Walz, C. Lavedan at all.]. // *Pharmacogenomics J.* – 2001. – №1. – P. 135-141.

115. Bypassing cellular EGF receptor dependence through epithelial-to-mesenchymal-like transitions / [S. Barr, S. Thomson, E. Buck at all.]. // *Clin Exp Metastasis.* – 2008. – V.25. – P. 685-693.

116. ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer cells / [K. M. Taylor, P. Vichova, N. Jordan at all.]. // *Endocrinology.* – 2008. – V.149. – P. 4912-4920.

117. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells / N. Kagara, N. Tanaka, S. Noguchi, T. Hirano. // *Cancer Sci.* – 2007. – V.98. – P. 692-697.

118. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells / [M. Hashemi, S. Ghavami, M. Eshraghi at all.]. // *Eur J Pharmacol.* – 2007. – V.557. – P. 9-19.

119. Simpson M. Increased abundance of labile intracellular zinc during cell proliferation was due to increased retention of extracellular zinc in 3T3 cells / M. Simpson. // *J Nutr Biochem.* – 2006. – V.17. – P. 541-547.

120. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion / M. E. Freeman, B. Kanyicska, A. Lerant, G. Nagy. // *Physiol Rev.* – 2000. – V.80. – P. 1523-1631.

121. Kelleher S. L. Zip3 plays a major role in zinc uptake into mammary epithelial cells and is regulated by prolactin. / S. L. Kelleher, B. Lönnerdal. // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2005. – V.288. – P. 1042-1047.

122. Geraki K. Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study / K. Geraki, M. J. Farquharson, D. A. Bradley. // *Phys Med Biol.* – 2002. – V.47. – P. 2327-2339.

123. Geraki K. X-ray fluorescence and energy dispersive X-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue / K. Geraki, M J. Farquharson, D. A. Bradley. // *Phys Med Biol.* – 2004. – V.49. – P. 99-110.

124. Zinc accumulation in N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumors is accompanied by an altered expression of ZnT-1 and metallothionein / [R. Lee, W. Woo, B. Lee at all.]. // *Exp Biol Med.* – 2003. – V.228. – P. 689-696.

125. Protein Kinase CK2 Triggers Cytosolic Zinc Signaling Pathways by Phosphorylation of Zinc Channel ZIP7 / [K. M. Taylor, S. Hiscox, R. I. Nicholson at all.]. // *Science Signaling.* – 2012. -№5. – P. 175-190.

126. Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor- $\alpha$  / [P. Meerarani, P. Ramadass, M. Toborek at all.]. // *Am J Clin Nutr.* – 2000. – V.71. – P. 81-87.

127. Johnson N.C. BRCA1 Zinc RING Finger Domain Disruption Alters Caspase Response in Ovarian Surface Epithelial Cells / N. C. Johnson, P. A. Kruk. // *Cancer Cell International.* – 2002. – №2. – P. 7-11.

128. Torreilles J. Nickel(II) as a temporary catalyst for hydroxyl radical generation / J. Torreilles, M. C. Guérin. // *FEBS Lett.* – 1990. – V.272. – P. 58-60.

129. Колиева Д. О. Биологическая роль железа и его обнаружение в фармацевтических препаратах / Д. О. Колиева, О. В. Неелова. // *Успехи современного естествознания.* – 2011. – №11. – P. 100-101.

130. Effects of cellular iron deficiency on the formation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. / [J. Eckard, J. Dai, J. Wu at all.]. // *Cancer Cell Int.* – 2010. – №1. – P. 28.

131. Dietary iron and heme iron intake and risk of breast cancer: a prospective cohort study / G. C. Kabat, A. B. Miller, M. Jain, T. E. Rohan. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2007. – №6. – P. 1306-1308.

132. Miller Z. K. Ferroportin and Iron Regulation in Breast Cancer Progression and Prognosis / Z. K. Pinnix, D. Lance. // *Sci Transl Med.* – 2010. – №2. – P. 43-56.

133. Iron status in Danish women, 1984-1994: a cohort comparison of changes in iron stores and the prevalence of iron deficiency and iron overload / [N. Milman, K. E. Byg, L. Ovesen at all.]. // *Eur J Haematol.* -2003. – V.71. – P. 51-61.

134. Association of age, sex, and race with body iron stores in adults: analysis of NHANES III data / L. R. Zacharski, D. L. Ornstein, S. Woloshin, L. M. Schwartz. // *Am Heart J.* – 2000. – V.140. – P. 98-104.

135. Prognostic and predictive molecular markers in DCIS: a review / S. Nofech-Mozes, J. Spayne, E. Rakovitch, W. Hanna. // *Adv Anat Pathol.* -2005. – V.12. – P. 256-64.

136. Linden T. Iron chelation, angiogenesis and tumor therapy / T. Linden, R. H. Wenger. // *Int J Cancer.* – 2003. – V.106. – P. 458-59.

137. Xi H. Does iron have a role in breast cancer? / H. Xi. // *Lancet Oncol.* – 2008. – №8. – P. 803-807.

138. Crouch Z. Use of erythropoietin-stimulating agents in breast cancer patients: a risk review / Z. Crouch, E. R. DeSantis. // *Am J Health Syst Pharm.* – 2009. – №13. – P. 1180-1185.

139. Hypoxia in breast cancer: role of blood flow, oxygen diffusion distances, and anemia in the development of oxygen depletion / P. Vaupel, A. Mayer, S. Briest, M. Hockel. // *Adv Exp Med Biol.* – 2005. – V.566. – P. 333-342.

140. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer / [M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol at all.]. // *Chem Biol Interact.* -2006. – V.160. – P. 1-40.

141. Kalluri R. The basics of epithelial-mesenchymal transition / R. Kalluri, R. A. Weinberg. // *J Clin Invest.* – 2009. – №6. – P. 1420-1428.

142. Polyak K. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits / K. Polyak, R. A. Weinberg. // *Nat Rev Cancer.* – 2009. – №4. – P. 265-273.

143. Torti S. V. Iron and cancer: more ore to be mined / S. V. Torti, F. M. Torti. // *Nat Rev Cancer.* – 2013. – №5. – P. 342-355.

144. Huang X. Does iron have a role in breast cancer? / X. Huang // *Lancet Oncol.* – 2008. – №8. – P. 803-807.

145. A link between premenopausal iron deficiency and breast cancer malignancy / [J. Jian, Q. Yang, Y. Shao at all.]. // *BMC Cancer.* – 2013. – V.13. – P. 307.

146. 17beta-estradiol inhibits iron hormone hepcidin through an estrogen responsive element half-site / [Q. Yang, J. Jian, S. Katz at all.]. // *Endocrinology.* – 2012. – №7. – P. 3170-3178.

147. Effects of iron deficiency and iron overload on angiogenesis and oxidative stress-a potential dual role for iron in breast cancer / [J. Jian, Q. Yang, J. Dai at all.]. // *Free Radic Biol Med.* – 2011. – V.50. – P. 841-847.

148. Kajdacsy-Balla The Effect of Iron on Prostate and Breast Cancer Cell Invasion / Kajdacsy-Balla. // *Metal Ions in Biology & Medicine.* – 2002. – №7. – P. 617-20.

149. Association between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine Excretion and Risk of Postmenopausal Breast Cancer: Nested Case-Control Study / [S. Loft1, A. Olsen, P. Moller at all.]. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2013. – V.22. – P. 1289-1296.

150. Intakes of dietary iron and heme-iron and risk of postmenopausal breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study /

[G. C. Kabat, A.J. Cross, Y. Park at all.]. // Am J Clin Nutr. – 2011. – V.94. – P. 613-614.

151. Kabat G. C. Cross Intakes of dietary iron and heme-iron and risk of postmenopausal breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study / G. C. Kabat, A. J. Cross. // Am J Clin Nutr. – 2010. – V.84. – P. 166-180.

152. Зербіно Д. Д. Ксенобіотики в диму сигарет: етіологічний стимул ураження судин / Д. Д. Зербіно, Т. М. Соломенчук, П. Гольцшуг // Новые медицинские технологии. – 2004. – №3. – С. 39-43.

153. Зотов С. В. Основи гігієни та медичної екології / С. В. Зотов. -К.: Освіта, 2003. -106 с.

154. Зюман Б. В. Важкі метали та екологічна безпека населення міста Кременчука / Б. В. Зюман, А. В. Пасенко. // Нові технології. -2009. – №2. – С. 117-123.

155. Котеленец А. И. Изучение биологических эффектов свинца при пероральном поступлении в организм в низких концентрациях / А. И. Котеленец, Н. В. Лопатина, А. А. Ушаков. – Москва, 2003. – С. 142-143.

156. Лимин Б. В. Гигиеническая диагностика загрязнения среды обитания солями тяжелых металлов: Монография / Б.В. Лимин. -СПб: СПб ГМА им. И.И. Мечникова. – 2003. – 130 с.

157. Трахтенберг И. М. Очерки возрастной токсикологии / И. М. Трахтенберг. – Киев, 2006. – 350с.

158. Архіпова Г. І. Вплив надлишкового вмісту важких металів у питній воді на організм людини / Г. І.Архіпова, Т. О. Мудрак, Д. В. Завертана. // Вісник НАУ. -2010. – №1. – С. 232-235.

159. Сейдахметова З. Ж. Повышение резистентности мембран секреторных клеток молочной железы природными антиоксидантами при свинцовой интоксикации / З. Ж. Сейдахметова. // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – №4. – С. 96-100.

160. Wong O. Cancer mortality study of employees at lead battery plants and lead smelters, 1947-1995 / O. Wong, F. Harris. // *Am J Ind Med.* – 2000. – V.38. – P. 255-270.

161. Martin M. B. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells / M. B. Martin, R. Reiter. // *Endocrinology.* – 2003. – №6. – P. 2425-36.

162. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions, an Indian study / [M. K. Siddiqui, S. Singh, P. K. Mehrotra at all.]. // *Environ Int.* – 2006. – №5. – P. 630-7.

163. Turnlund J. R. Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope copper-65 / J. R. Turnlund. // *Am J Clin Nutr.* – 1989. – №5. – P. 870-878.

164. Halliwell B. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview / B. Halliwell, J. M. Gutteridge. // *Methods Enzymol.* – 1990. – V.186. – P. 1-85.

165. Finney L. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression / L. Finney // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2009. – №1. – P. 88-94.

166. Goodman V. L. Copper deficiency as an anti-cancer strategy / V. L. Goodman, G. J. Brewer, S. D. Merajver. // *Endocr Relat Cancer.* – 2004. – №2. – P. 255-263.

167. Sproull M. Antiangiogenic therapy through copper chelation / M. Sproull, M. Brechbiel, K. Camphausen. // *Expert Opin Ther Targets.* – 2003. – №3. – P. 405-409.

168. Daniel K. G. Copper storage diseases: Menkes, Wilson's, and cancer / K. G. Daniel. // *Front Biosci.* – 2004. – V.9. – P. 2652-2662.

169. Guo K. F. Variation of urinary and serum trace elements (Ca, Zn, Cu, Se) in bladder carcinoma in China / K. F. Guo // *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012. – №5. – P. 2057-2061.

170. Silva M. P. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence / M. P. Silva. // BMC Res Notes. – 2012. – №5. – P. 94.

171. Jain S. Tetrathiomolybdate-associated copper depletion decreases circulating endothelial progenitor cells in women with breast cancer at high risk of relapse / S. Jain. // Ann Oncol. – 2013. – V.13. – P. 72-85.

172. Gupte A. Copper chelation by D-penicillamine generates reactive oxygen species that are cytotoxic to human leukemia and breast cancer cells / A. Gupte, R. J. Mumper. // Free Radic Biol Med. – 2007. – №9. – P. 1271-1278.

173. Ishida S. Enhancing tumor-specific uptake of the anticancer drug cisplatin with a copper chelator / S. Ishida. // Cancer Cell. – 2010. – V.6. – P. 574-583.

174. Hassouneh B. Tetrathiomolybdate promotes tumor necrosis and prevents distant metastases by suppressing angiogenesis in head and neck cancer / B. Hassoune. // Mol Cancer Ther. – 2007. – №6. – P. 1039-1045.

175. Phase I study of copper-binding agent ATN-224 in patients with advanced solid tumors / [S. A. Lowndes, A. Adams, A. Timms at all.]. // Clin Cancer Res. – 2008. – №22. – P. 7526-34.

176. Copper chelator ATN-224 inhibits endothelial function by multiple mechanisms / [S. A. Lowndes, H. V. Sheldon, S. Cai at all.]. // Microvasc Res. – 2009. – №3. – P. 314-26.

177. Шахназарова А. С. Роль биологического мониторинга в изучении загрязнения окружающей среды / А. С. Шахназарова, А. Т. Ахматова, Б. К. Кадырова. // Вестник КРСУ. – 2010. – №2. – С. 115-118.

178. Оганян А. А. Биологическая роль хрома, применение дихромата калия в фармацевтическом анализе / А. А. Оганян, О. В. Неелова. // Успехи современного естествознания. – 2011. – №8 – С. 227-227.

179. Gennete K. Cromate metabolism in liver microsomes / K. Gennete. // Biological Trace Element Research. – 1979. – V.1. – P. 55-62.

180. Kilic E. Chromium and manganese levels in the scalp hair of normals and patients with breast cancer / E. Kilic, R. Saraymen, A. Demiroglu. // *Biol Trace Elem Res.* – 2004. – №3. – P. 19-25.

181. John B. Popular Diet Supplement May Be A Cancer Risk / B. John V.A. Stephen. // *ScienceDaily.* – 2013. – T25. – P. 16-26.

182. Absorption and retention of nickel from drinking water in relation to food intake and nickel sensitivity / [G. D. Nielsen, U. Soderberg, P. J. Jorgensen at all.]. // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 1999. – №1. – P. 67-75.

183. Beyersmann D. Effects of carcinogenic metals on gene expression / D. Beyersmann. // *Toxicology letters.* – 2002. – №1. – P. 63-68.

184. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells / [M. B. Martin, R. Reiter, T. Pham at all.]. // *Endocrinology.* – 2003. – №6. – P. 2425-2436.

185. Increased levels of transition metals in breast cancer tissue / J. G. Ionescu, J. Novotny, V. Stejskal, A. Latsch. // *Neuro Endocrinol Lett.* – 2006. – №1. – P. 36-39.

186. Cihan Y. B. Trace elements and heavy metals in hair of stage III breast cancer patients / Y. B. Cihan, S. Sozen, O. S. Yildirim. // *Biol Trace Elem Res.* – 2011. – №3. – P. 360-379.

187. Cadmium concentration in biological media of breast cancer patients / [L. Strumylaite, A. Bogusevicius, O. Abdrachmanovas at all.]. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2011. – №2. – P. 511-517.

188. Concentration of cadmium, nickel and aluminium in female breast cancer / [H. Romanowicz-Makowska, E. Forma, M. Brys at all.]. // *Pol J Pathol.* – 2011. – №4. – P. 257-261.

189. Role of Cadmium and Nickel in Estrogen Receptor Signaling and Breast Cancer: Metalloestrogens or Not? / N. B. Aquino, M. B. Sevigny, J. Sabangan, M.C. Louie. // *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* – 2012. – №3. – P. 189-224.

190. Islam E. Assessing potential dietary toxicity of heavy metals in selected vegetables and food crops. / E. Islam, X. E. Yang, Z. L. He, Q. Mahmood. // *J Zhejiang Univ Sci B*. – 2007. – №1. – P. 1-13.

191. A cross-talk between NFAT and NF-kappaB pathways is crucial for nickel-induced COX-2 expression in Beas-2B cells / [T. Cai, X. Li, J. Ding at all.]. // *Current cancer drug targets*. – 2011. – №5. – P. 548-559.

192. Carcinogenesis of nickel alloys in the hamster following intratracheal instillation / [S. Ivankovic, W. J. Zeller, D. Komitowski at all.]. // *Schriftenreihe der Bundesanstalt fu r Arbeitsschutz, Dortmund*. – 1988. – P. 1-58.

193. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells / [M. B. Martin, R. Reiter, T. Pham at all.]. // *Endocrinology*. – 2003. – №6. -P. 2425-2436.

194. Metal-dependent folding and stability of nuclear hormone receptor DNA-binding domains / L. Y. Low, H. Hernandez, C. V. Robinson, R. O'Brien. // *J Mol Biol*. – 2002. – №1. – P. 87-106.

195. Alterations of histone modifications and transgene silencing by nickel chloride / [Q. Ke, T. Davidson, H. Chenet at all.]. // *Carcinogenesis*. – 2006. – №7. – P. 1481-1488.

196. Ke Q. Nickel compounds induce histone ubiquitination by inhibiting histone deubiquitinating enzyme activity / Q. Ke, T. P. Ellen, M. Costa. // *Toxicol Appl Pharmacol*. – 2008. – №2. – P. 190-199.

197. Heterochromatinization as a potential mechanism of nickel-induced carcinogenesis / [T. P. Ellen, T. Kluz, M. E. Harder at all.]. // *Biochemistry*. -2009. – №21. – P. 4626-4632.

198. Arita A. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium / A. Arita, M. Costa. // *Metallomics*. -2009. – №3. – P. 222-228.

199. Karaczyn A. A. Ni(II) affects ubiquitination of core histones H2B and H2A / A. A. Karaczyn, F. Golebiowski, K. S. Kasprzak. // *Exp Cell Res*. – 2006. – №17. – P. 3252-3259.

200. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state / [K. M. McGarvey, J. A. Fahrner, E. Greene at all.]. // *Cancer research*. – 2006. – №7. – P. 3541-3549.

201. Kasprzak K. S. The role of chromatin damage in nickel-induced carcinogenesis. A review of recent developments / K. S. Kasprzak, W. Bal, A. A. Karaczyn. // *J Environ Monit*. – 2003. – №2. – P. 183-187.

202. Reactive oxygen-induced carcinogenesis causes hypermethylation of p16(Ink4a) and activation of MAP kinase / [B. Govindarajan, R. Klafter, M. S. Miller at all.]. // *Mol Med*. – 2002. – №1. – P. 1-8.

203. Reduced Fhit protein expression in nickel-transformed mouse cells and in nickel-induced murine sarcomas / [R. Kowara, K. Salnikow, B. A. Diwan at all.]. // *Mol Cell Biochem*. – 2004. – №1-2. – P. 195-202.

204. Beyersmann D. Effects of carcinogenic metals on gene expression / D. Beyersmann. // *Toxicol Lett*. – 2002. – №1- 3. – P. 63-68.

205. Reactive oxygen species-activated Akt/ASK1/p38 signaling pathway in nickel compound-induced apoptosis in BEAS 2B cells / [J. Pan, Q. Chang, X. Wang at all.]. // *Chemical research in toxicology*. – 2010. – №3. – P. 568-577.

206. Seoane A. I. Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay / A. I. Seoane, F. N. Dulout. // *Mutat Res*. – 2001. – №2. – P. 99-106.

207. Aurora a and B overexpression and centrosome amplification in early estrogen-induced tumor foci in the Syrian hamster kidney: implications for chromosomal instability, aneuploidy, and neoplasia / [A. E. Hontz, S. A. Li, W. L. Lingle at all.]. // *Cancer research*. – 2007. – №7. – P. 2957-2963.

208. Ignat M. The Removal of Zn<sup>2+</sup> Ions from Groundwater using Hydroxyapatite Nanoparticles / M. Ignat, M. Alexandroaei, N. C. Lungu. // *Rev Chim*. – 2011. – №5. – P. 518-521.

209. Ichijo T. Observations on structural features and characteristics of biological apatite crystals / T. Ichijo, Y. Yamashita, T. Terashima. // *Bull Tokyo Med Dent Univ*. – 1993. – V.40. – P. 193-205.

210. New relationships between breast microcalcifications and cancer / R. Baker, K. D. Rogers, N. Shepherd at all.]. // *Br J Cancer*. – 2010. – V.34 – P. 1034-1039.

211. Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes / [D. G. DeNardo, H. T. Kim, S. Hilsenbeck at all.]. // *Mol Endocrinol*. – 2005. – №2. – P. 362-378.

212. International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors / K. Dahlman-Wright, V. Cavailles, S. A. Fuqua at all.]. // *Pharmacol. Rev.* – 2006. – №4. – P. 773-81.

213. Thomas C. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy / C. Thomas, J. A. Gustafsson. // *Nature reviews Cancer*. – 2011. – №8 – P. 597-608.

214. Liang J. Estrogen and Cancer / J. Liang, Y. Shang. // *Annu. Rev. Physiol.* – 2013. – V.75. – P. 225-240.

215. Hsp90 in the continuum of breast ductal carcinogenesis: Evaluation in precursors, preinvasive and ductal carcinoma lesions / [F. Zagouri, T. N. Sergentanis, A. Nonni at all.]. // *BMC Cancer*. – 2010. – V.10. – P. 353-60.

216. Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? / C. Lanari, V. Wargon, P. Rojas, A. A. Molinolo. // *Endocr Relat Cancer*. – 2012. – V.19. – P. 35-50.

217. Progesterone receptors: various forms and functions in reproductive tissues / [S. Gadkar-Sable, C. Shah, G. Rosario at all.]. // *Front. Biosci.* – 2005. – №10. – P. 2118-30.

218. Rakha E. A. Combinatorial biomarker expression in breast cancer / E. A. Rakha, J. S. Reis-Filho, I. O. Ellis. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2010. – V.120. – P. 293-308.

219. Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients / [S.

Liu, S. K. Chia, E. Mehl at all.]. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2010. – V.119. – P. 53-61.

220. Clinically Used Breast Cancer Markers Such As Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Are Unstable Throughout Tumor Progression / [L. S. Lindström, E. Karlsson, U. M. Wilking at all.]. // *J Clin Oncol.* – 2012. – V.30. – P. 2602-2608.

221. Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer / [Y. Omoto, S. Inoue, S. Ogawa at all.]. // *Cancer Lett.* – 2001. – V.163. – P. 207-212.

222. Weigel M. T. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction / M. T. Weigel, M. Dowsett. // *Endocr Relat Cancer.* – 2010. – V.17. – P. 245-262.

223. Roscovitine confers tumor suppressive effect on therapy-resistant breast tumor cells / B. C. Nair, S. Vallabhaneni, R. R. Tekmal, R. K. Vadlamudi. // *Breast Cancer Research.* – 2011. – V.13. – P. 80-89.

224. Molecular Classification of Estrogen Receptor-positive/Luminal Breast Cancers / F. C. Geyer, D. N. Rodrigues, B. Weigelt, J. S. Reis-Filho. // *Adv Anat Pathol.* – 2012. – V.19. – P. 39-53.

225. Герштейн Е. С. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы / Е. С. Герштейн, Н. Е. Кушилинский. // *практ. Онкология.* – 2002. – №1. – С. 38-44.

226. Increased estrogen receptor beta expression during mammary carcinogenesis / [M. Esslimani-Sahla, A. Kramar, J. Simony-Lafontaine at all.]. // *Clin Cancer Res.* – 2005. – №9. – P. 3170-4.

227. The association between cadmium, lead and mercury blood levels and reproductive hormones among healthy, premenopausal women / [L. W. Jackson, P. P. Howards, J. Wactawski-Wende at all.]. // *Hum Reprod.* – 2011. – №10. – P. 2887-2895.

228. The Role of Calcium in the Activation of Estrogen Receptor-Alpha / [D. S. Divekar, G. B. Storchan, K. Sperle at all.]. // *Cancer Res.* – 2011. – №5. – P. 1658-1668.

229. Fiszman G. L. Molecular Mechanisms of Trastuzumab Resistance in HER2 Overexpressing Breast Cancer / G. L. Fiszman, M. A. Jasnis. // *Int J Breast Cancer.* – 2011. – V.15. – P. 425-436.

230. Madrid M. A. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status / M. A. Madrid, R. W. Lo. // *Breast Cancer Res.* – 2004. – №6. – P. 593-600.

231. Mitri Z. The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy / Z. Mitri, T. Constantine, R. O'Regan. // *Chemother Res Pract.* – 2012. – №23. – P. 3525-33.

232. Rakha E. A. Triple-negative/basal-like breast cancer: review / E. A. Rakha, I. O. Ellis // *Pathol.* – 2009. – №1. – P. 40-47.

233. Murphy C. G. HER2 breast cancer therapies: a review / C. G. Murphy, S. Modi. // *Biologics.* – 2009. – №3. – P. 289-301.

234. Pertuzumab plus Trastuzumab plus Docetaxel for Metastatic Breast Cancer / [J. Baselga, J. Cortes, S-B. Kim at all.]. // *N Engl J Med.* – 2012. – V.366. – P. 109-119.

235. Gl̆ck S. Optimizing Chemotherapy-Free Survival for the ER/HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Patient / S. Gl̆ck, C. L. Arteaga, C. K. Osborne. // *Clin Cancer Res.* – 2011. – V.17. – P. 5559-5561.

236. HER2 and TOP2A as predictive markers for anthracycline-containing chemotherapy regimens as adjuvant treatment of breast cancer: a meta-analysis of individual patient data / [A. D. Leo, C. Desmedt, M. S. Bartlett at all.] // *Lancet Oncol.* – 2011. – V.12. – P. 1134-1142.

237. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential / [R. Yerushalmi, R. Woods, P. M. Ravdin at all.]. // *Lancet Oncol.* – 2010. – V.11. – P. 174-183.

238. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group / [M. Dowsett, T. O. Nielsen, R. ArHern at all.]. // *J Natl Cancer Inst.* – 2011. – V.103. – P. 1656-1664.

239. Петров С. В. Общие принципы иммуногистохимической диагностики и классификации опухолей. / С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – Казань, 2000, – С. 39-57.

240. Quantitative assessment Ki-67 score for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer / [J. R. Brown, M. P. DiGiovanna, B. Killelea at all.]. // *Lab Invest.* – 2014. – V.94. – P. 98-106.

241. Panel members: Stratekes for subtypes — dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 / [A. Goldhirsch, W. C. Wood, S. A. Coates at all.]. // *Ann Oncol.* – 2011. – V.22. – P. 1736-1747.

242. Ki67 expression and the effect of neo-adjuvant chemotherapy on luminal HER2-negative breast cancer / [Y. Horimoto, A. Arakawa, M. Tanabe at all.]. // *BMC Cancer.* – 2014. – V.14. – P. 550-563.

243. Петрова С. В. Общие принципы иммуногистохимической диагностики и классификации опухолей. В кн. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / С. В. Петрова, Н. Т. Райхлина. – Казань, 2000, С. 39-57.

244. p53 Expression in Node-Positive Breast Cancer Patients: Results from the Cancer and Leukemia Group B 9344 Trial (159905) / [J. F. Lara, A. D. Thor, L. G. Dressler at all.]. // *Clin Cancer Res.* – 2011. – V.17. – P. 5170-5178.

245. Suzuki K. Recent Advances in p53 Research and Cancer Treatment / K. Suzuki, H. Matsubara. // *J Biomed Biotechnol.* – 2011. – V.13. – P. 403-410.

246. Fitzgibbons M. D. Prognostic Factors in Breast Cancer / M. D. Fitzgibbons. // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2000. – V.124. – P. 966-978.

247. p53 Expression in Triple Negative Breast Carcinomas: Evidence of Age-Related and Racial Differences / S. Davion, M. Sullivan, S. Rohan, K. P. Siziopikou. // *J Cancer Therapy.* – 2012. – №3. – P. 649-654.

248. HER-2 Positive and p53 Negative Breast Cancers are Associated With Poor Prognosis / [D. Al-azawi, S. Leong, L. Wong E at all.]. // *Cancer Invest.* – 2011. – V.29. – P. 365-369.

249. Structural studies of p53 inactivation by DNA-contact mutations and its rescue by suppressor mutations via alternative protein – DNA interactions / [A. Eldar, H. Rozenberg, Y. Diskin-Posner at all.]. // *Nucl Acids Res.* – 2013. – V.41. – P. 1-12.

250. Prognostic interaction between expression of p53 and estrogen receptor in patients with node-negative breast cancer: results from IBCSG Trials VIII and IX / [A. S. Coates, K. A. Millar E, S. A. OrToole at all.]. // *Breast Cancer Res.* – 2012. – V.14. – P. 143-154.

251. Lacroix M. p53 and breast cancer, an update / M. Lacroix, R-A. Toillon, G. Leclorcq. // *Endocr Rel Cancer.* – 2006. – V.13. – C. 293-325.

252. Accumulation of p53 Determined by Immunohistochemistry as a Prognostic Marker in Node Negative Breast Cancer; Analysis According to St Gallen Consensus and Intrinsic Subtypes / [S-Y. Jung, J. Jeong, S. H. Shin at all.]. // *J Surg Oncol.* – 2011. – V.103. – P. 207-211.

253. Bcl-2 family member Bfl-1/A1 sequesters truncated bid to inhibit its collaboration with pro-apoptotic Bak or Bax / [A. B. Werner, E. de Vries, S. W. Tait at all.]. // *The Journal of biological chemistry.* – 2002. – №25. – P. 22781-22788.

254. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received / [S-J. Dawson, N. Makretsov, F. M. Blows at all.]. // *BJC.* – 2010. – V.103. – P. 668-675.

255. The BCL-2 Family Reunion / [J. E. Chipuk, T. Moldoveanu, L. Lambi at all.]. // *Molecular Cell.* – 2010. – V.37. – P. 299-310.

256. Martin L. A. BCL-2: A New Therapeutic Target in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer? / L. A. Martin, M. Dowsett. // *BJC.* – 2013. – №1. – P. 7-9.

257. Heterogeneity of Bcl-2 in metastatic breast carcinoma / [A. P. Subhawong, H. Nassar, M. K. Halushka at all.]. // *Modern Pathol.* – 2010. – V.23. – P. 1089-1096.

258. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast Cancer / [Y. Nadler, R. L. Camp, J. M. Giltane at all.]. // *Breast Cancer Res.* – 2008. – №10. – P. 1-12.

259. Prognostic influence of BCL2 expression in breast cancer / [K. T. Hwang, J. W. Woo, H. C. Shin at all.]. // *Int J Cancer.* – 2012. – V.131. – P. 1109-1119.

260. Prognostic value of Bcl-2 in two independent populations of estrogen receptor positive breast cancer patients treated with adjuvant endocrine therapy / [M. S. Larsen, K. Bjerre, A. Giobbie-Hurder at all.]. // *Acta Oncologica.* – 2012. – V.51. – P. 781-789.

261. Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification / [M. S. Larsen, K. Bjerre, A. Giobbie-Hurder at all.]. // *Curr Atheroscler Rep.* – 2009. – V.11(3). – P. 206-13.

262. Plasma osteopontin levels and expression in adipose tissue are increased in obesity / [J. Gómez-Ambrosi, V. Catalán, B. Ramírez at all.]. // *J Clin Endocrinol Metab.* – 2007. – №9. – P. 3719-27.

263. Chronic intermittent hypoxia induces 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat heart / [P. Klusonová, L. Reháková, G. Borchert at all.]. // *Endocrinol.* – 2009. – №9. – P. 4270-7.

264. Osteopontin promotes fibrosis in dystrophic mouse muscle by modulating immune cell subsets and intramuscular TGF-beta / [S. A. Vetrone, E. Montecino-Rodrigues, E. Kudryashova at all.]. // *J Clin Invest.* – 2009. – №6. – P. 1583-94.

265. Expression of the breast cancerresistance protein in breast cancer / [I. F. Faneyte, P. M. Kristel, M. Maliepaard at all.]. // *Clin Cancer Res.* – 2002. – №4. – P. 1068-74.

266. The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis / [K. A. Furger, R. K. Menon, A. B. Tuck at all.]. // *Curr Mol Med.* – 2001. – №5.- P. 621-32.

267. Primary breast carcinoma: association of mammographic calcifications with osteopontin expression / [X. Wang, L. Chao, G. Ma at all.]. // *Radiology.* – 2010. – №1. – P. 69-78.

268. Osteopontin expression profiles predict pathological and clinical outcome in breast cancer / [N. Patani, F. Jouhra, W. Jiang at all.] // *Anticancer Res.* – 2008. – №6. – P. 4105-10.

269. Osteopontin expression according to molecular profile of invasive breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study / [A. Ribeiro-Silva, J. P. Oliveira at all.]. // *Int J Biol Markers.* – 2008. – №3. – P. 154-60.

270. Kapoor S. Inhibition of osteopontin dependent carcinogenesis / S. Kapoor. // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2008. – №8. – P. 927-8.

271. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins / [H. H. Kampinga, J. Hageman, M. J. Vos at all.]. // *Cell Stress Chaperones.* – 2009. – №1. – P. 105-11.

272. Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets?, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* / [A. A. Khalil, N. F. Kabary, F. Sahar at all.]. // *Reviews on Cancer.* – 2011. – №2. – P. 89-104.

273. Маргулис Б. А. Двойная роль шаперонов в ответе клетки и всего организма на стресс / Б. А. Маргулис, И. В. Гужова. // *Цитология.* -2009. – №3. – С. 219-228.

274. Sharp S. Inhibitors of the HSP90 molecular chaperone: current status / S. Sharp, P. Workman. // *Adv Cancer Res.* – 2006. – V.95. – P.323-48.

275. Kregel K. C. Ileal shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance / K. C. Kregel. // *J. Appl. Physiol.* – 2002. – №5. – P. 2177-2186.

276. V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors / [O. M. Grbovic, A. D. Basso, A. Sawai at all.]. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2006. – №1. – P. 57-62.

277. Grad I. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones / I. Grad, D. Picard. // *Mol Cell Endocrin.* – 2007. – №1-2. – P. 2-12.

278. Picard D. Chaperoning steroid hormone action / D. Picard. // *Trends Endocrin Metab.* – 2006. – №6. – P. 229-35.

279. Akalin A. A novel mechanism for chaperone-mediated telomerase regulation during prostate cancer progression / A. Akalin, L. W. Elmore, H. L. Forsythe at all.]. // *Cancer Res.* – 2001. – №12. – P. 4791-6.

280. Grad I. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones / I. Grad, D. Picard. // *Mol Cell Endocrin.* – 2007. – №2. – P. 2-12.

281. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Expression and Breast Cancer / [F. Zagouri, E. Bournakis, K. Koutsoukos at all.]. // *Pharmaceuticals.* – 2012. – №5. – P. 1008-1020.

282. Koga P. Hsp90 inhibition transiently activates Src kinase and promotes Src-dependent Akt and Erk activation / P. Koga, W. Xu, T. S. Karpova. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – №30. – P. 11318-11322.

283. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness / [B. K. Eustace, T. Sakurai, J. K. Stewart at all.]. // *Nat. Cell Biol.* – 2004. – №6. – P. 507-14.

284. Conklin M. W. Why the stroma matters in breast cancer / M. W. Conklin, P. J. Keely. // *Cell Adhesion & Migration.* – 2012. – №6. – P. 249-260.

285. Association between MMP1-1607 1G>2G Polymorphism and Head and Neck Cancer Risk: A Meta-Analysis / C. Zhang, X. Song, M. Zhu, S. Shi. // *PloS One.* – 2013. – №2. – P. 285-293.

286. Yan C. Regulation of Matrix Metalloproteinase Gene Expression / C. Yan, D. D. Boyd. // *J Cell Physiol.* – 2007. – V.211. – P. 19-26.

287. Selective Blockade of Matrix Metalloprotease-14 with a Monoclonal Antibody Abrogates Invasion, Angiogenesis, and Tumor Growth in Ovarian

Cancer / [R. Kaimal, R. Aljumaily, S. L. Tressel at all.]. // *Cancer Res.* – 2013. – V.73. – P. 2457-2467.

288. Lenglet S. Role of Matrix Metalloproteinase-8 in Atherosclerosis. / S. Lenglet, F. Mach, F. Montecucco. // *Mediators of Inflammation.* – 2013. – V.13. – P. 126-132.

289. Polymorphisms in matrix metalloproteinases MMP1 and MMP9 are associated with primaryopen-angle and angle closure glaucoma in a Pakistani population / S. Micheal, S. Yousaf, M. I. Khan, F. Akhtar. // *Mol Vis.* – 2013. – V.19. – P. 441-447.

290. Matrix Metalloproteinase 1 (MMP1) Is Associated with Early-Onset Lung Cancer / [W. Sauter, A. Rosenberger, L. Beckmann at all.]. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2008. – V.17. – P. 1127-1135.

291. Matrix metalloproteinase Mmp-1a is dispensable for normal growth and fertility in mice and promotes lung cancer progression by modulating inflammatory responses / [M. Fanjul-Fernández, A. R. Folgueras, A. Fueyo at all.]. // *J Biol Chem.* – 2013. – V.288. – P. 14647-14656.

292. Cdc25A Regulates Matrix Metalloprotease 1 through Foxo1 and Mediates Metastasis of Breast Cancer Cells / [X. Feng, Z. Wu, Y. Wu at all.]. // *Mol Cell Biol.* – 2011. – V.16. – P. 3457-3471.

293. Significantly upregulated TACSTD2 and Cyclin D1 correlate with poor prognosis of invasive ductal breast cancer / [H. Lin, J. F. Huang, J. R. Qiu at all.]. // *Exp Mol Pathol.* – 2013. – V.94. – P. 73-78.

294. Mannello F. What does matrix metalloproteinase-1 expression in patients with breast cancer really tell us? / F. Mannello. // *BMC Medicine.* – 2011. – №9. – P. 95.

295. Gumbiner B. M. Regulation of cadherin adhesive activity. / B. M. Gumbiner // *J Cell Biol.* – 2000. – V.148. – P. 399-404.

296. Kowalski P. J. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases / P. J. Kowalski, M. A. Rubin, C. G. Kleer. // *Breast Cancer Res.* – 2003. – №6. – P. 217-222.

297. E-Cadherin Status in Breast Cancer Correlates With Histologic Type but Does Not Correlate With Established Prognostic Parameters / [S. H. Qureshi, M. D. Linden, G. Divine at all.]. // *Am J Clin Pathol.* – 2006. – V.125. – P. 377-385.

298. E-cadherin expression in invasive breast cancer / [C. Suciuc, A. M. Cîmpean, A. M. Mureşan at all.]. // *Romanian Journal of Morphology and Embryology.* – 2008. – №4. – P. 517-523.

299. Younis L. K. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer / L. K. Younis, H. E. Sakka, I. Haque. // *Int J Health Sci (Qassim).* – 2007. – №1. – P. 43-51.

300. Howard E. M. Expression of E-cadherin in high risk breast cancer. / E. M. Howard, A.K. Lau. // *J cancer res Clin Oncol.* – 2005. – V.131. – P. 14-18.

301. Evaluation of prognostic parameters of E-cadherin status in breast cancer treatment / [A. Brzozowska, T. Sodolski, D. Duma at all.]. // *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* – 2012. – №3. – P. 541-546.

302. Роль репаративного ензиму Об-метилгуанін-ДНК-метилтрансферази у хіміотерапії злоякісних гліом / Л. А. Шапошнік, О. Я. Главацький, Х. Ахмад, Є. В. Кузенко. // *Вісник СумДУ.* – 2012. -№1. – С. 85-94.

303. Jacinto F. V. MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend / [F. V. Jacinto, M. Esteller. // *DNA Repair.* – 2007. – №6. – P. 1155-1160.

304. Pattern of expression of genes linked to epigenetic silencing in human breast cancer / [K. Munot, S. M. Bell, S. Lane at all.]. // *Human Pathology.* – 2006. – V.37. – P. 989-999.

305. The Modified Human DNA Repair Enzyme O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Is a Negative Regulator of Estrogen Receptor-Mediated Transcription upon Alkylation DNA Damage / [K. C. Teo, H. K. Oh, R. B. Ali at all.]. // *Mol Cell Biol.* – 2001. – №20. – P. 7105-7114.

306. Protein phosphorylation is a regulatory mechanism for O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase in human brain tumor cells / [K .S.

Srivenugopal, S. R. Mullapudi, J. Shou at all.]. // *Cancer Res.* – 2000. – №2. – P. 282-287.

307. Inverse correlation between the expression of O6-methylguanine-DNA methyl transferase (MGMT) and p53 in breast cancer / [T. Osanai, Y. Takagi, Y. Toriya at all.]. // *Japanese Journal of Clinical Oncology.* – 2005. – V.35. – P. 121-125.

308. Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis / [S. Sharma, F. Salehi, B. W. Scheithauer at all.]. // *Anticancer Research.* – 2009. – V.29. – P. 3759-3768.

309. Methylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) promoter gene in triple-negative breast cancer patients / [C. Fumagalli, G. Pruneri, P. Possanzini at all.]. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2012. – №1. – P. 131-137.

310. MGMT and PTEN as potential prognostic markers in breast cancer / [J. C. Neto, M. M. Ikoma, K. C. Carvalho at all.]. // *Experimental and Molecular Pathology.* – 2012. – V.92. – P. 20-26.

311. Dvorak H. F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumour angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy / H. F. Dvorak. // *J Clin Oncol.* – 2002. – V.20. – P. 4368-80.

312. Ferrara N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H. P. Gerber, J. LeCouter. // *Nature Medicine.* – 2003. – №9. – P. 669 – 676.

313. VEGF-B: a survival, or an angiogenic factor? / [X. Li, C. Lee, Z. Tang at all.]. // *Cell Adh Migr.* – 2009. – №3. – P. 322-327.

314. Antibody to vascular endothelial growth factor slows growth of an androgen-independent xenograft model of prostate cancer. / [W. D. Fox, B. Higgins, K. M. Maiese at all.]. // *Clin Cancer Res.* – 2002. – №8. – P. 3226-3231.

315. Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients / [Y. Amo, M. Masuzawa, Y. Hamada at all.]. // *British Journal of Dermatology.* – 2004. – №1. – P. 160-161.

316. Jeganathan V. S. Safety and efficacy of intravitreal anti-VEGF injections for age-related macular degeneration / V. S. Jeganathan, N. Verma. // *Curr Opin Ophthalmol.* – 2009. – V.20. – P. 223-5.

317. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis / [X. Huang, H. D. Halicka, F. Traganos at all.]. // *Cell Prolif.* – 2005. – №4. – P. 223-43.

318. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy / [D. Nowis, M. Makowski, T. Stokłosa at all.]. // *Acta Biochimica Polonica.* – 2005. – №2. – P. 339-352.

319. Bethany A. On how mammalian transcription factors recognize methylated DNA / A. Bethany. // *Epigenetics.* – 2013. – №2. – P. 131-137.

320. Kohli R. M. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation / R. M. Kohli, Y. Zhang // *Nature.* – 2002. – №7. – P. 472-479.

321. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer / [S. B. Baylin, M. Esteller, M. R. Rountree at all.]. // *Hum Mol Genet.* – 2001. – V.10. – P. 687-692.

322. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little / M. Ehrlich // *Oncogene.* – 2002. – T21. – P. 5400-5413.

323. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. / [K.D. Hansen, W. Timp, H.C. Bravo et all.] // *Nat Genet.* – 2011. – V.43. – P. 768-775.

324. Linkage of DNA Methylation Quantitative Trait Loci to Human Cancer Risk / [H. R Heyn, S. Sayols, C. Moutinho at all.]. // *Cell Reports.* – 2014. – №7. – P. 331-338.

325. Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells identify a subpopulation of cells involved in early carcinogenesis / [H. Berman, J. Zhang, Y.G. Crawford at all.]. // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* – 2005. – V.70. – P. 317-327.

326. Integrated analysis of gene expression, CpG island methylation, and gene copy number in breast cancer cells by deep sequencing / Z. Sun, Y. W. Asmann, K. R. Kalari, B. Bot. // PLoS One. – 2011. – №2. – P. 12-21.

327. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo / [N. Shukeir, P. Pakneshan, G. Chen at all.]. // Cancer Res. – 2006. – V.66. – P. 9202-9210.

328. Definition of the landscape of promoter DNA hypomethylation in liver cancer / [B. Stefanska, J. Huang, B. Bhattacharyya at all.]. // Cancer Res. – 2011. – V.71. – P. 5891-5903.

329. Reversal of the hypomethylation status of urokinase (uPA) promoter blocks breast cancer growth and metastasis / P. Pakneshan, M. Szyf, R. Farias-Eisner, S. A. Rabbani. // J Biol Chem. – 2004. – V.279. – P. 31735-31744.

330. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis / D. C. Allred, J. M. Harvey, M. Berardo, G. M. Clark. // Mod. Path. – 1998. – V.11. – P. 155-168.

331. Wolff A. C. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer / A. C. Wolff, M. E. Hammond, J. N. Schwartz. // J Clin Oncol. – 2007. – V.25. – P. 118-145.

332. Гмурман В.Е. Теория вероятности и математическая статистика: Учеб. Пособие для вузов / В. Е. Гмурман. – М.: Высш.шк., 1998. – 479 с.

333. Козлов М. В. Элементы теории вероятностей в примерах и задачах / М. В. Козлов. – М.: Изд-во МГУ, 1990. – 344 с.

334. Leroy N. Structure and substitutions in fluoroapatite / N. Leroy, E. Bres. // Eur Cells Bul Materials. – 2001. – №2. – P. 36 – 48.

335. Primary breast carcinoma: association of mammographic calcifications with osteopontin expression / [X. Wang, L. Chao, G. Ma at all.]. // Radiology. – 2010. – №1. – P. 69-78.

336. Osteopontin expression profiles predict pathological and clinical outcome in breast cancer / [N. Patani, F. Jouhra, W. Jiang at all.]. // *Anticancer*. – 2008. – №6. – P. 4105-10.

337. Structural disorder in proteins brings order to crystal growth in biomineralization / L. Kalmar, D. Homola, G. Varga, P. Tompa // *Bone*. 2012. – №3. – P. 528-34.

338. The flexible polyelectrolyte hypothesis of protein-biomineral interaction / [G.K. Hunter, J. O'Young, B. Grohe at all.]. // *Langmuir*. – 2010. – №24. – P. 18639-46.

339. Chen Y. C. Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss / Y.C. Chen, D.M. Sosnoski, A.M. Mastro. // *Breast Cancer Research*. – 2010. – V.12. – P. 215-20.

340. Jefferies C. Antiviral TRIMs: friend or foe in autoimmune and autoinflammatory disease? / C. Jefferies, C. Wynne, R. Higgs. // *Nat Rev Immunol*. – 2011. – №9. – P. 617-25.

341. Hydroxyapatite nanoparticle-containing scaffolds for the study of breast cancer bone metastasis / [S. P. Pathi, G. D. Debra, D. W. Lin at all.]. // *Biomaterials*. – 2011. – №22. – P. 5112-5122.

342. Chen Y. C. Breast cancer metastasis to the bone: mechanisms of bone loss / Y. C. Chen, D. M. Sosnoski, A. M. Mastro. // *Breast Cancer Research*. – 2010. – V.12. – P. 215-230.

343. A novel 3-d mineralized tumor model to study breast cancer bone metastasis / S. P. Pathi, C. Kowalczewski, R. Tadipatri, C. Fischbach // *PLoS One*. – 2010. – №1. – P. 8849-8858.

344. Calcium hydroxyapatite promotes mitogenesis and matrix metalloproteinase expression in human breast cancer cell lines // [M. P. Morgan, M. M. Cooke, P. A. Christopherson at all.]. // *Mol Carcinog*. – 2001. – №3. – P. 111-117.

345. Microcalcifications in breast cancer: novel insights into the molecular mechanism and functional consequence of mammary mineralization / [R. F. Cox,

A. Hernandez-Santana, S. Ramdass at all.]. // *British Journal of Cancer*. – 2012. – V.106. – P. 525-537.

346. Finney L. Copper and angiogenesis: unravelling a relationship key to cancer progression / L. Finney. // *Clin Exp Pharmacol Physiol*. – 2009. – №1. – P. 88-94.

347. Goodman V. L. Copper deficiency as an anti-cancer strategy / V. L. Goodman, G. J. Brewer, S. D. Merajver. // *Endocr Relat Cancer*. – 2004. – №2. – P. 255-263.

348. Прозоровский В. Кровеносные сосуды и рак / В. Прозоровский. // *Наука и жизнь*. – 2006. – №9. – P. 9-14.

349. Sproull M. Antiangiogenic therapy through copper chelation / M. Sproull, M. Brechbiel, K. Camphausen // *Expert Opin Ther Targets*. – 2003. – №3. – P. 405-409.

350. Jain S. Tetrathiomolybdate-associated copper depletion decreases circulating endothelial progenitor cells in women with breast cancer at high risk of relapse / S. Jain. // *Ann Oncol*. – 2013. – V.13. – P. 52-64.

351. The flexible polyelectrolyte hypothesis of protein-biomineral interaction" / [G. K. Hunter, J. O'Young, B. Grohe at all.]. // *Langmuir*. – 2010. – №24. – P. 18639-46.

352. HER-2 Positive and p53 Negative Breast Cancers are Associated With Poor Prognosis / [D. Al-azawi, S. Leong, L. Wong at all.]. // *Cancer Invest*. – 2011. – V.29. – P. 365-369.

353. Martin L. A. BCL-2: A New Therapeutic Target in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer? / L. A. Martin, M. Dowsett. // 2013. – №1. – P. 7-9.

354. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received / [S. J. Dawson, N. Makretsov, F. M. Blows at all.]. // *Br. J. Cancer*. – 2010. – V.103. – P. 668-675.

355. Targeting BCL-2 with the BH3 Mimetic ABT-199 in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer / [F. Vaillant, D. Merino, L. Lee1 at all.]. // *Cancer Cell*. – 2013. – №1. – P. 120-129.

356. Lindeman G. J. Targeting BCL-2 in breast cancer: exploiting a tumor lifeline to deliver a mortal blow? / G. J. Lindeman, J. E. Visvader. // *Breast Cancer Manage.* – 2013. – №2. – P. 1-4.

357. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets / [A. J. Souers, J. D. Levenson, E. R. Boghaert at all.]. // *Nat. Med.* – 2013. – V.19. – P. 202-208.

358. Pulukuri S. M. Matrix metalloproteinase-1 promotes prostate tumor growth and metastasis / S. M. Pulukuri, J. S. Rao. // *Int J Oncol.* – 2008. – V.32. – P. 757-765.

359. Matrix Metalloproteinase 1 (MMP1) Is Associated with Early-Onset Lung Cancer / [W. Sauter, A. Rosenberger, L. Beckmann at all.]. // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2008. – V.17. – P. 1127- 1135.

360. Hanahad D. The hallmarks of cancer / D. Hanahad, R. A. Weinberg. // *Cell*. – 2000. – №1. – P. 57-70.

361. Neckers L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone / L. Neckers. // *J. Biosci.* – 2007. – №3. – P. 517-530.

362. Mitochondrial chaperones in cancer: from molecular biology to clinical diagnostics / A. M. Czarnecka, C. Campanella, G. Zummo, F. Capello. // *Cancer Biol. Trer.* – 2006. – №7. – P. 714-720.

363. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy / [E. Schmitt, M. Gehrman, M. Brunet at all.]. // *J Leukoc Biol.* – 2007. – №1. – P. 15-27.

364. Hsp90 in the continuum of breast ductal carcinogenesis: Evaluation in precursors, preinvasive and ductal carcinoma lesions / [F. Zagouri, T. N. Sergentanis, A. Nonni at all.]. // *BMC Cancer.* – 2010. – №10. – P. 353-60.

365. Workman P. Combinatorial attack on multistep oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone / P. Workman. // *Cancer Lett.* – 2004. – V.206. – P. 149-157.

366. Grad I. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones / I. Grad, D. Picard // *Mol Cell Endocrin.* – 2007. – V.275. – P. 2-12.

367. Association between HSP90 and Her2 in Gastric and Gastroesophageal Carcinomas / [S. Berezowska, A. Novotny, K. Bauer at all.] // *PLoS One.* – 2013. – №7. – P. 37-45.

368. Inhibition of heat shock protein 90 impairs epidermal growth factor-mediated signaling in gastric cancer cells and reduces tumor growth and vascularization in vivo / [S. A. Lang, D. Klein, C. Moser at all.]. // *Mol Cancer Ther.* – 2007. – V.6. – P. 1123-1132.

369. Eming S. A. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms / S. A. Eming, T. Krieg, J. M. Davidson. // *Journal of Investigative Dermatology.* – 2007. – V.127. – P. 514-525.

370. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells / [C. S. Ma, E. K. Deenick, M. Batten at all.]. // *J. Exp. Med.* – 2012. – №7. – P. 1241-1253.

371. Oldham E. D. 1. Estrogen receptor-mediated inhibition of inflammatory signaling: implications for treatment of breast cancer 2. Small molecule coactivator-binding inhibitors / E. D. Oldham. – Urbana, 2011. -138 p.

372. Endoplasmic reticulum stress controls M2 macrophage differentiation and foam cell formation / [J. Oh, A. E. Riek, S. Weng at all.]. // *Journal of Biological Chemistry.* – 2012. – №15. – P. 11629-41.

373. Webb S. J. Infrared studies of isolated normal and tumour DNA / S. J. Webb, R. Bather. // *Phys. Med. Biol.* – 1970. – №2. – P. 271-280.