

АНОТАЦІЯ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANNOTATION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

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

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

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

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

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

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

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