

Т.М. Яловенко  
Н.Ю. Лук'янова  
В.Ф. Чехун

Інститут експериментальної  
патології, онкології  
і радіобіології  
ім. Р.Є. Кавецького  
НАН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** рак молочної залози, гепсидин, молекулярний підтип РМЗ, злоякісність, анемія, гемоглобін.

## ЗМІНИ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГЕПСИДИНУ У СИРОВАТЦІ КРОВІ ТА ЙОГО ЕКСПРЕСІЇ У ПУХЛИННИХ КЛІТИНАХ ЗАЛЕЖНО ВІД КЛІНІКО-ПАТОЛОГІЧНИХ ОСОБЛИВОСТЕЙ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

**Мета:** визначення концентрації гепсидину у сироватці крові (сГЕПС) та його експресії у пухлинних клітинах (пГЕПС) залежно від клініко-патологічних особливостей раку молочної залози (РМЗ) та аналіз зв'язку сГЕПС і пГЕПС з наявністю анемії у хворих на РМЗ. **Об'єкт та методи:** зразки операційного матеріалу та сироватки крові 65 хворих на РМЗ I–II стадії (у тому числі 18 пацієнтів з анемією) віком від 23 до 89 років. Загальноклінічні, гістологічні, імуногістохімічні, імуноферментні, статистичні. **Результати:** встановлено значну варіабельність концентрації сГЕПС у хворих на РМЗ, що вказує на можливість використання сГЕПС як індивідуального показника порушення метаболізму заліза у пацієнтів із РМЗ. Отримано дані, що свідчать про кореляційні зв'язки між рівнями сГЕПС, експресією пГЕПС у хворих на РМЗ II стадії та з гістологічною будовою пухлин. Експресія пГЕПС прямо корелює з метастатичним ураженням регіонарних лімфатичних вузлів та низьким ступенем диференціювання РМЗ. Визначено особливості показників сГЕПС та пГЕПС залежно від молекулярного підтипу РМЗ. Продемонстровано прямий кореляційний зв'язок між концентрацією сГЕПС та анемією, а також зворотний кореляційний зв'язок із рівнем гемоглобіну у хворих на РМЗ. **Висновки:** одержані дані свідчать про важливу роль ГЕПС у прогресуванні пухлинної хвороби, а також його асоціацію з більш агресивними формами РМЗ (базальний молекулярний підтип), що дає підстави розглядати сГЕПС і пГЕПС як маркери порушень гомеостазу заліза при маніфестації РМЗ, у тому числі у хворих з анемією. Одержані результати можуть бути використані для системної оцінки стану гомеостазу заліза у пацієнтів із РМЗ.

Рак молочної залози (РМЗ) посідає в онкології особливе місце з причин частоти, особливостей епідеміології, різноманітності біологічних і молекулярних характеристик пухлин, широкого спектра методів лікування та неоднозначного прогнозу. Статистичні дані свідчать про неухильне зростання захворюваності і смертності від РМЗ практично в усьому світі [1]. Незважаючи на вдосконалення схем і режимів лікування та більш ранню діагностику цього захворювання (особливо в осіб молодого та середнього віку), у багатьох країнах ефективність лікування пацієнтів із РМЗ все ще недостатня. Значною мірою це зумовлено високою гетерогенністю патології і недостатністю сучасної методології оцінки вірогідності відповіді на лікування та індивідуального прогнозу ризику прогресування раку. З огляду на це, безумовно, важливим є комплексний підхід, який базується на врахуванні не лише молекулярно-біологічних особливостей пухлини, але й низки показників загального стану організму в цілому.

Останніми роками все більшу увагу приділяють порушенням метаболізму заліза при онкологічній патології [2, 3]. Результати проведених нами досліджень свідчать про асоціацію порушень метаболізму залізовмісного білка феритину в організмі хворих із клініко-морфологічними та молекулярними особливостями РМЗ [4]. Іншим білком, який також має важливе значення у регуляції метаболізму заліза у нормі та при різних патологічних процесах, є гепсидин (ГЕПС), який вважають системним гормональним регулятором метаболізму заліза [5]. Необхідність вивчення ГЕПС у хворих на РМЗ ґрунтується на численних дослідженнях, які свідчать про порушення його експресії у клітинах раку товстої кишки, нирки, передміхурової, молочної залози та зв'язок з особливостями клінічного перебігу пухлинного процесу. Так, зниження експресії ГЕПС у клітинах РМЗ пригнічує прогресування захворювання за рахунок зменшення кількості внутрішньоклітинного заліза. Циркулюючий ГЕПС, який секретується печінкою, чинить силь-

ний вплив на феропортин-опосередкований експорт заліза в пухлинних клітинах, а дефіцит ГЕПС призводить до збільшення виходу заліза з пухлинних клітин і, як наслідок — до інгібіції росту пухлини [6–9]. Проведений нами ретроспективний аналіз виживаності хворих на РМЗ продемонстрував, що показники експресії ГЕПС у пухлинних клітинах (пГЕПС) можуть бути використані як прогностичний маркер. Про це свідчить доведений зв'язок експресії вказаного протеїну з виживаністю хворих з урахуванням таких показників злоякісності РМЗ, як рецепторний статус та проліферативна активність пухлин [10]. Ми також встановили залежність між рівнем ГЕПС у сироватці крові (сГЕПС), клініко-патологічними особливостями РМЗ та чутливістю до неoad'ювантної терапії [11, 12].

Незважаючи на відомості про зміни рівнів сГЕПС і пГЕПС у хворих на РМЗ, в літературі відсутні дані щодо зв'язку цих показників із деякими клінічними характеристиками загального стану хворих, зокрема з рівнем гемоглобіну. Як відомо, зниження вмісту гемоглобіну є клінічним показником анемії, що часто може виникати у хворих на рак різного генезу, та може бути зумовлено низкою причин, до яких належать порушення метаболізму заліза при хронічних захворюваннях, кровотечах та ін. Анемія, діагностована до лікування, може прогресувати після операцій, хіміо- або променевої терапії і призводити до погіршення загального стану хворих [12, 13]. Як свідчать дані літератури, у патогенезі анемії значна роль належить саме ГЕПС, який розглядається як діагностичний критерій і потенційний маркер порушень метаболізму заліза у пацієнтів із різними патологічними процесами [14, 15].

У зв'язку з вищевикладеним, мета дослідження полягала у визначенні концентрації сГЕПС та експресії пГЕПС залежно від клініко-патологічних особливостей РМЗ та аналізі зв'язку сГЕПС і пГЕПС з наявністю анемії у хворих на РМЗ.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліджено концентрацію сГЕПС і експресію пГЕПС та проаналізовано ці показники у зіставленні з даними комплексного клінічного обстеження 65 хворих на РМЗ I–II стадії, які перебували на стаціонарному лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2013–2016 рр. Усі пацієнтки дали інформовану згоду на використання їх біологічних матеріалів і клінічних даних з науковою метою. Стадію пухлинного процесу визначали за Міжнародною класифікацією пухлин (TNM, 7-ме видання, 2009 р.).

Для верифікації пухлинного процесу проведено стандартне гістологічне дослідження операційного матеріалу хворих; гістологічний тип пухлин оцінювали за Міжнародною гістологічною класифікацією пухлин ВООЗ (2008 р.). В операційному матеріалі кожної хворої визначали ступінь структурної

та клітинної атипії, на підставі чого встановлювали ступінь диференціювання пухлин, поділяючи їх на високо- (G1), помірно- (G2) та низькодиференційовані (G3). Неод'ювантну поліхіміотерапію хворим не проводили. Залежно від клінічних показань виконували органозберігаючі операції або радикальні мастектомії за Маденом і ад'ювантну поліхіміотерапію згідно зі стандартами лікування, прийнятими в Україні, за схемами FAC або AC з інтервалом 21 день; кількість курсів поліхіміотерапії коливалася від 4 до 6. Післяопераційне променеве лікування проводили на гамма-терапевтичному апараті «TERAGAM» (разова вогнищева доза — 2 Гр, сумарна вогнищева доза — 40 Гр на ділянку післяопераційного рубця, пахову, парастеральну та надключичну ділянки).

Концентрацію сГЕПС досліджували методом твердофазного імуноферментного аналізу (ІФА) за допомогою автоматичного біохімічного та імуноферментного аналізатора Chem Well 2900 згідно із введеною програмою протоколів до наборів Human Hcpcidin (Hcpc 25) ELISA Kit, Cusabio, Китай. Кров у пацієнтів брали до операції натщесерце. Зразки сироватки крові для ІФА отримували відповідно до рекомендацій, зазначених в інструкціях до наборів: цільну кров відстоювали 2 год при кімнатній температурі, після чого центрифугували 1500 об./хв 20 хв і відбирали сироватку, яка зберігалася при  $-20^{\circ}\text{C}$  до початку ІФА аналізу. У нормі в сироватці крові здорових людей концентрація ГЕПС коливається у широкому діапазоні — від 17 до 286 нг/мл [16].

Оцінку молекулярного підтипу РМЗ проводили на основі результатів імуногістохімічного (ІГХ) дослідження рецепторів естрогенів (RE), прогестерону (RP), епідермального фактора росту типу 2 (Her2/neu), з використанням MkAT antiRE (клон 1D5), antiRP (клон PgR636) та antiHER/2neu (клон c-erbB-2; DakoCytomation, Данія). Визначали кількість клітин із позитивною експресією маркерів, оцінюючи ступінь прояву ІГХ-реакції: «+++» — сильний, «++» — помірний, «+» — низький або «0» — відсутність експресії. На паралельних парафінових зрізах проводили ІГХ-дослідження експресії пГЕПС. Як первинні антитіла використовували MkAT, специфічні до ГЕПС-25 (клон ab30760; Abcam, США); для візуалізації результатів реакції — набір реактивів EnVision system (Dako LSAB2 system, Данія) відповідно до рекомендацій виробника. Гістологічні зрізи дофарбовували гематоксиліном Майєра. Для оцінки експресії ГЕПС застосовували напівкількісний метод. Оцінку результатів проводили за допомогою оптичної мікроскопії ( $\times 100$ – $400$ ) з використанням класичного методу H-Score:

$$S = N0(\%) + N1(\%) + N2(\%) + N3(\%),$$

де S — показник «H-Score», N0 — кількість клітин з відсутньою експресією, N1, N2 та N3 — кількість клітин з низькою, середньою та високою експресією. Кінцевий результат підрахунку виражали у балах та

ким чином: 0–49 — відсутність експресії, 50–100 балів — низька, 101–200 балів — середня, 201–300 балів — висока експресія пГЕПС [17].

У хворих визначали рівень гемоглобіну у крові на гемоаналізаторі «Particle Counter 210» (ErmaInc., Токіо, Японія). Рівень гемоглобіну < 120,0 г/л був роздільною межею для діагностики анемії у жінок [18]. Таким чином, аналіз рівня гемоглобіну виявив анемію у 18 хворих, нормальні значення гемоглобіну — у 47 пацієток із РМЗ.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили з використанням методів варіаційної статистики із застосуванням програми STATISTICA 6.0. Кореляційний аналіз проводили шляхом обчислення коефіцієнта кореляції Пірсона. За критичний рівень статистичної значущості приймали  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Загальну клінічну характеристику хворих, результати морфологічного та ІГХ дослідження пухлин представлено у табл. 1. Аналіз клінічних даних показав, що кількість хворих на РМЗ I стадії становила 29,2%, II стадії — 70,8%. Вік пацієнтів коливався від 23 до 89 років, середній вік становив  $55,4 \pm 7,3$  року.

За результатами комплексного обстеження (рентгенологічне, ультразвукове, лабораторне) у 29,2% хворих діагностовано метастази у РЛВ (N1–3), віддалених метастазів раку не виявлено. Стан менструальної функції був різним, при цьому у більшості пацієток (72,3%) була менопауза. Морфологічне дослідження операційного матеріалу показало, що частіше діагностували інфільтративний протоковий РМЗ (67,7%). Ступінь диференціювання пухлин також був різним з переважанням помірного ступеня диференціювання (G2). При ІГХ-дослідженні виділено такі молекулярні підтипи РМЗ: люмінальний А (ER+, PR+, Her2/neu–), частота якого була найвищою — 30 (46,2%); люмінальний Б (ER+, PR+, Her2/neu+) — 18 (27,7%); базальний (ER–, PR–, Her2/neu–) — 11 (16,9%) та Her2/neu+ (ER–, PR–, Her2/neu+) — 6 (9,26%).

У всіх обстежених хворих ми провели паралельний аналіз експресії ГЕПС та концентрації сГЕПС залежно від клініко-патологічних особливостей пухлинного процесу. У більшості пацієнтів ( $n = 36$ ; 55,3%) значення сГЕПС були вищими за референтні. Визначено індивідуальні коливання концентрації сГЕПС у межах від 87 нг/мл (мінімальні значення) до 358 нг/мл (максимальні значення), що вказує на значну варіабельність цього показника у хворих на РМЗ. Середня концентрація сГЕПС становила  $261,4 \pm 14$  нг/мл. При цьому у 49 (75,4%) хворих значення концентрації сГЕПС були вищими, а у 16 (24,6%) — нижчими за середній показник сГЕПС в обстеженій групі. Що стосується значень пГЕПС, то 61,5% пухлин характеризувались позитивною експресією досліджуваного білка.

Таблиця 1

### Загальна клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ I–II стадії

Показник	Кількість хворих	
	n	%
Загальна кількість хворих	65	100
<b>Вік хворих, років</b>		
Середній	$55,4 \pm 7,3$	
Коливання віку	23–89	
<b>Менструальна функція</b>		
Збережена	18	27,7
Менопауза	47	72,3
<b>Стадія РМЗ за TNM</b>		
I	19	29,2
II	46	70,8
<b>Метастази у регіонарних лімфатичних вузлах (РЛВ) (категорія N)</b>		
N0	46	70,8
N1–N3	19	29,2
<b>Гістологічний тип пухлини</b>		
Інфільтративний протоковий рак	44	67,7
Інфільтративний часточковий рак	21	32,3
<b>Ступінь диференціювання пухлини</b>		
G1 (високий)	18	27,7
G2 (помірний)	33	50,8
G3 (низький)	14	21,5
<b>Молекулярний підтип пухлини</b>		
Люмінальний А	30	46,2
Люмінальний Б	18	27,7
Базальний	11	16,9
Her2/neu+	6	9,2

Ми зіставили індивідуальні показники концентрації сГЕПС та експресії пГЕПС з клініко-патологічними особливостями РМЗ. Як свідчать дані табл. 2, не відмічено залежності вказаних показників від віку хворих на РМЗ ( $p > 0,05$ ). Натомість, порівняння рівня сГЕПС і частоти ГЕПС-позитивних (ГЕПС+) пухлин зі стадією РМЗ виявило статистично достовірні ( $p < 0,05$ ) зміни обох показників при II стадії, що вказує на суттєвіші порушення метаболізму ГЕПС. Зіставлення досліджених показників залежно від кількості метастазів у РЛВ не продемонструвало статистичної різниці ( $p > 0,05$ ) для сГЕПС, тоді як відносна кількість хворих із ГЕПС+ пухлинами була достовірно ( $p < 0,05$ ) більшою за наявності 1–3 метастазів у РЛВ.

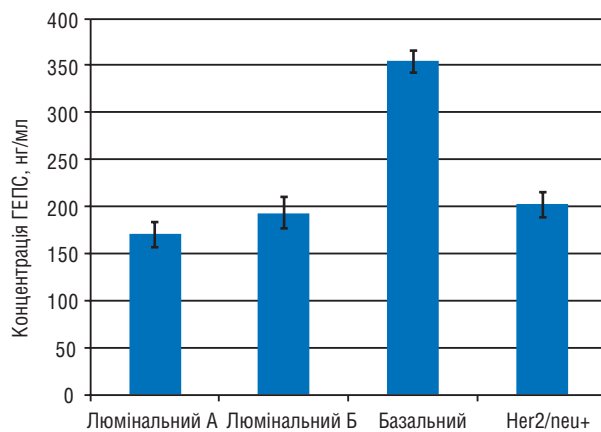
Досить цікавими виявилися результати порівняння вмісту сГЕПС і пГЕПС залежно від гістологічного типу РМЗ. У хворих на інфільтративний протоковий рак концентрація сГЕПС була достовірно вищою ( $198 \pm 17$  нг/мл,  $p < 0,05$ ), ніж у пацієнтів із часточковим раком ( $144 \pm 11$  нг/мл). Проте відносна частка пацієнтів з ГЕПС+ пухлинами хоча і була більшою серед хворих на інфільтративний протоковий (56,8%), ніж на часточковий рак (47,6%), достовірно не відрізнялася ( $p > 0,05$ ), що, можливо, пов'язано з гетерогенною морфологією пухлин.

Не виявлено достовірної залежності концентрації сГЕПС від ступеня диференціювання пухлини; водночас частота ГЕПС+ пухлин була достовірно більшою (92,8%;  $p < 0,05$ ) у хворих на РМЗ низького ступеня диференціювання (G3).

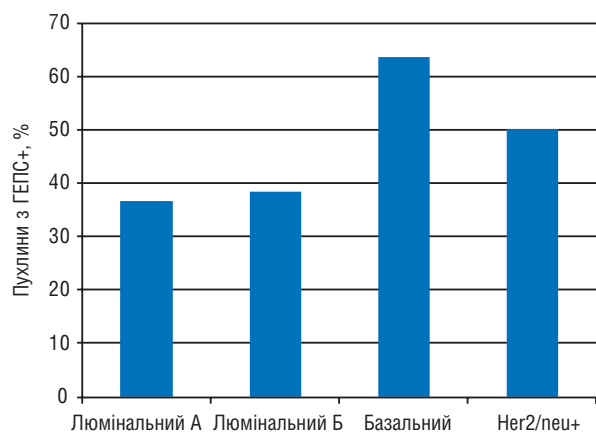
Аналіз сГЕПС і пГЕПС у хворих на РМЗ різного молекулярного профілю виявив достовірні зміни концентрації сГЕПС у бік збільшення (до  $314 \pm 11$  нг/мл;  $p < 0,05$ ) у хворих на РМЗ базального молекулярного підтипу (рис. 1) і достовірно більшу частку ГЕПС+ пухлин того ж молекулярного підтипу (63,6%;  $p < 0,05$ ) порівняно з частотою ГЕПС+ пухлин серед інших молекулярних підтипів, зокрема Her2/neu+ (50,0%), люмінальний Б (38,8%), люмінальний А (36,6%) (рис. 2; див. табл. 2).

Враховуючи різноманітність значень сГЕПС і частоти з ГЕПС+ пухлин, проведено кореляційний аналіз цих показників із клініко-патологічними особливостями пухлинного процесу. Як свідчать результати кореляційного аналізу (табл. 3), висока концентрація сГЕПС помірно прямо корелює зі стадією захворювання ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,05$ ), гістологічним типом пухлин ( $r = 0,41$ ;  $p < 0,05$ ), молекулярним базальним підтипом РМЗ ( $r = 0,42$ ;  $p < 0,05$ ); тоді як ступінь диференціювання пухлин, наявність метастазів у РЛВ і вік хворих практично не корелюють із концентрацією сГЕПС ( $r = 0,13$ ;  $r = 0,19$ ;  $r = 0,03$  відповідно). З іншого боку, кількість ГЕПС+ пухлин помірно прямо корелює зі стадією РМЗ, ступенем диференціювання пухлини ( $r = 0,28$ ;  $r = 0,34$  відповідно;  $p < 0,05$ ) та наявністю метастазів у РЛВ ( $r = 0,38$ ;  $p < 0,05$ ), що є підставою для припущення щодо ролі пГЕПС у метастазуванні РМЗ.

Враховуючи варіабельність клінічного перебігу РМЗ залежно від молекулярного підтипу, ми вважали за потрібне більш детально представити відомості про рівень сГЕПС та експресію пГЕПС при РМЗ різних молекулярних підтипів. Як зазначено вище, встановлено прямий кореляційний зв'язок між рівнем сГЕПС та базальним молекулярним підтипом РМЗ,



**Рис. 1.** Концентрація сГЕПС (нг/мл) у хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів: достовірне підвищення показника у пацієнтів із РМЗ базального молекулярного підтипу порівняно з іншими молекулярними підтипами ( $p < 0,05$ )



**Рис. 2.** Кількість ГЕПС+ пухлин у хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів ( $p < 0,05$ )

Таблиця 2

Рівень сГЕПС та кількість ГЕПС+ пухлин залежно від клініко-патологічних особливостей РМЗ

Показник	Кількість хворих		Концентрація сГЕПС, нг/мл	Кількість хворих з ГЕПС+ пухлинами, n (%)
	n	%		
<b>Вік хворих, років</b>				
23–50	32	100	190 ± 10,8	10 (31,3)
51–89	33	100	191 ± 15	12 (36,4)
			$p > 0,05$	$p > 0,05$
<b>Стадія РМЗ за класифікацією TNM</b>				
I	19	100	136 ± 18	6 (31,5)
II	46	100	297 ± 11*	34 (49,9)*
			$p < 0,05$	$p < 0,05$
<b>Метастази у РЛВ (категорія N)</b>				
N0	46	100	183 ± 15	12 (26,1)
N1–N3	19	100	189 ± 12	13 (68,4)*
			$p > 0,05$	$p < 0,05$
<b>Гістологічний тип пухлини</b>				
Інфільтративний протоковий рак	44	100	198 ± 17*	25 (56,8)
Інфільтративний часточковий рак	21	100	144 ± 11	10 (47,6)
			$p < 0,05$	$p > 0,05$
<b>Ступінь диференціювання пухлини</b>				
G1 (високий)	18	100	189 ± 10	7 (38,8)
G2 (помірний)	33	100	191 ± 16	18 (54,5)
G3 (низький)	14	100	179 ± 14	13 (92,8)*
			$p > 0,05$	$p < 0,05$
<b>Молекулярний підтип пухлини</b>				
Люмінальний А	30	100	170 ± 14	11 (36,6)
Люмінальний Б	18	100	193 ± 17	7 (38,8)
Базальний	11	100	314 ± 11*	7 (63,6)
Her2/neu+	6	100	202 ± 13	3 (50,0)
			$p > 0,05$	$p < 0,05$

\* $p < 0,05$  порівняно з іншими групами.



Таблиця 3

Коефіцієнти кореляції (r) сГЕПС та пГЕПС із клініко-патологічними характеристиками РМЗ

Показник		r	Показник		r
пГЕПС	Вік хворих	0,05	сГЕПС	Вік хворих	0,03
	Стадія захворювання	0,28*		Стадія захворювання	0,58*
	Метастази у РЛВ	0,38*		Метастази у РЛВ	0,19
	Гістологічний тип пухлини	0,08		Гістологічний тип пухлини	0,41*
	Ступінь диференціювання пухлини	0,34*		Ступінь диференціювання пухлини	0,13
	Базальний підтип РМЗ	0,26		Базальний підтип РМЗ	0,42*

\*p &lt; 0,05.

який, як відомо, характеризується найбільш агресивним клінічним перебігом. Базальний молекулярний підтип РМЗ був діагностований у 11 хворих із середніми значеннями концентрації сГЕПС —  $314 \pm 11$  нг/мл ( $p < 0,05$  при порівнянні з іншими молекулярними підтипами РМЗ, що, за даними літератури, перевищує максимальні референтні значення) [16]. При цьому діапазон індивідуальних коливань також був значним — від 275 до 358 нг/мл, а у 9 (81,8%) хворих значення сГЕПС були вищими за середні у групі. У хворих із люмінальним А підтипом РМЗ середня концентрація сГЕПС становила  $170 \pm 14$  нг/мл з індивідуальними коливаннями від 87 до 191 нг/мл. У 13 (43,3%) пацієнтів концентрація сГЕПС була вищою, а у 17 (56,7%) — нижчою за середні значення у групі. Концентрація ГЕПС у групі з люмінальним Б підтипом РМЗ коливалася від 117 до 248 нг/мл із середнім значенням  $193 \pm 17$  нг/мл. При цьому у 8 (43,4%) пацієнтів ці показники були нижчими, а у 10 (56,6%) — вищими за середні значення у групі. У групі з Her2/neu+ підтипом РМЗ середні значення концентрації ГЕПС становили  $202 \pm 13$  нг/мл з коливаннями від 148 до 274 нг/мл. У 4 (66,7%) хворих концентрація була вищою, тоді як лише у 2 (33,3%) — нижчою за середні значення у групі.

Подібну залежність спостерігали і при дослідженні пухлинної тканини — 63,6% клітин РМЗ базального підтипу характеризувалися позитивною експресією ГЕПС ( $p < 0,05$  при порівнянні з іншими молекулярними підтипами РМЗ). Зазначимо також, що частота ГЕПС+ пухлин мала тенденцію до підвищення у хворих на Her2/neu+ РМЗ (50,0% ГЕПС+ пухлин) порівняно з люмінальним А та люмінальним Б РМЗ (36,6 та 38,8% відповідно;  $p > 0,05$ ), тоді як рівні сГЕПС у хворих з люмінальним А, люмінальним Б та Her2/neu- підтипами практично не відрізнялися між собою.

Враховуючи значну кількість даних літератури щодо участі ГЕПС у розвитку анемії [19, 20], важливим видавалося дослідження зв'язку між показниками сГЕПС та пГЕПС у хворих на РМЗ з анемією. Загальна клінічна характеристика пацієнтів з анемією наведена у табл. 4, з якої випливає, що у більшості пацієнток (66,4%) була менопауза. Анемію діагностовано у 18 (27,7%) пацієнток. Частка хворих

на РМЗ І стадії з анемією становила 27,8%, у 72,2% виявлено ІІ стадію патологічного процесу. Результати комплексного обстеження (рентгенологічне, ультразвукове, лабораторне) свідчать про наявність метастазів (N1–3) у РЛВ у 33,3%. В усіх хворих на РМЗ з анемією був інфільтративний протоковий рак. Високий ступінь диференціювання пухлин у цій підгрупі не виявлено, тоді як помірний був у більшій частині пацієнток — у 61,1%, а низький — у 38,9%. Що стосується частоти розподілу молекулярних підтипів РМЗ, то Her2/neu+ пухлини не зафіксовано. Найбільшу частку (38,9%) становив базальний молекулярний підтип. Люмінальний А та Б підтипи виявлено у меншій кількості хворих — у 27,8 та 33,3% відповідно.

Таблиця 4

Загальна клінічна характеристика хворих на РМЗ з анемією

Показник	Кількість хворих	
	n	%
Загальна кількість хворих	18	100
<b>Вік хворих, років</b>		
Середній	$58,3 \pm 4,6$	
Коливання віку	28–84	
<b>Менструальна функція</b>		
Збережена	6	33,3
Менопауза	12	66,4
<b>Стадія РМЗ за TNM</b>		
I	5	27,8
II	13	72,2
<b>Метастази у РЛВ (категорія N)</b>		
N0	12	66,7
N1–3	6	33,3
<b>Гістологічний тип пухлини</b>		
Інфільтративний протоковий рак	18	100
Інфільтративний часточковий рак	0	0
<b>Ступінь диференціювання пухлини</b>		
G1 (високий)	0	0
G2 (помірний)	11	61,1
G3 (низький)	7	38,9
<b>Молекулярний підтип РМЗ</b>		
Люмінальний А	5	27,8
Люмінальний Б	6	33,3
Базальний	7	38,9
Her2/neu+	0	0

Аналізуючи зв'язок між рівнем сГЕПС та експресією пГЕПС з анемією хворих на РМЗ, ми виявили, що показники сГЕПС пацієнтів з анемією були достовірно вищими за такі у хворих без анемії, при цьому відзначили обернену помірну кореляцію концентрації сГЕПС із рівнем гемоглобіну, про що свідчить коефіцієнт кореляції ( $r = -0,50$ ,  $p < 0,05$ ) (табл. 5).

Варто зауважити, що максимальні значення сГЕПС у групі без анемії (158 нг/мл) були меншими за мінімальні значення у хворих з анемією (178 нг/мл), при цьому індивідуальні рівні гемоглобіну у пацієнтів з анемією були значно нижчими і коливалися в діапазоні від 79 до 108 г/л, у хворих без анемії — від 121 до 139 г/л. Ми не встановили кореляційного зв'язку між експресією пГЕПС хворих на РМЗ та таким важливим показником стану пацієнтів, як гемоглобін ( $r = -0,11$ ;  $p > 0,05$ ).

Таблиця 5  
Концентрації сГЕПС та гемоглобіну у хворих на РМЗ з анемією

Анемія	Кількість хворих	Маркер		
		Концентрація сГЕПС, нг/мл	Гемоглобін, г/л	пГЕПС, середня кількість балів, H-score
+	18	234,0 ± 4,8* (178–267)**	96,7 ± 11,4 (79–108)	229,0 ± 13,2 (174–287)
–	47	129,0 ± 2,9 (102–158)	137,8 ± 8,9 (121–139)	194,0 ± 17,3 (142–214)

\* $p < 0,05$ ; \*середні значення; \*\*індивідуальні коливання показників.

Отже, результати дослідження демонструють варіабельність показників сГЕПС і пГЕПС у хворих на РМЗ різної гістологічної будови і різних молекулярних підтипів. Поряд з цим визначено деякі кореляції. Зокрема, кореляційний прямий зв'язок підвищення рівня сГЕПС та експресії пГЕПС зі стадією РМЗ, сГЕПС з гістологічною будовою РМЗ (інфільтративний протоковий рак), також кореляцію експресії пГЕПС із метастатичним ураженням РЛВ, що може свідчити про важливу роль ГЕПС у прогресуванні пухлинної хвороби. Грунтуючись на тому, що гірший клінічний перебіг РМЗ пов'язаний із низьким ступенем диференціювання пухлин [21], який прямо корелює з експресією пГЕПС, можна припустити асоціацію ГЕПС з проліферацією, ростом пухлини і, можливо, з такою кардинальною характеристикою пухлини, як ступінь її злоякісності. Про це свідчать отримані нами результати щодо асоціації рівня сГЕПС та пГЕПС з молекулярним підтипом РМЗ, зокрема з базальним молекулярним підтипом, який характеризується найбільш агресивним клінічним перебігом порівняно з іншими молекулярними підтипами РМЗ.

Разом з тим у групі хворих на РМЗ нами встановлено прямий кореляційний зв'язок між концентрацією сГЕПС та анемією, а також зворотний помірний зв'язок із рівнем гемоглобіну ( $r = -0,50$ ,  $p < 0,05$ ). Хоча у літературі є дані стосовно провідної ролі ГЕПС у патогенезі анемії хворих онкологічного профілю [22], ми не виявили статистичної залежності між наявністю анемії, рівнем гемоглобіну та експресією пГЕПС, можливо, через невелику кількість хворих.

Отримані результати узгоджуються з даними літератури про зв'язок ГЕПС із онкологічною патологією молочної залози. Так, R. Orlandi та співавтори [23] показали, що рівень ГЕПС у хворих на РМЗ був  $> 4$  рази вищим порівняно із показниками сГЕПС пацієнтів із доброякісними новоутвореннями молочної залози. Водночас відзначено позитивну кореляцію рівня сГЕПС зі вмістом феритину і негативну — з рівнем трансферину. На сьогодні феритин вважають загальноприйнятним показником, який характеризує обмін заліза в організмі, і використовують для контролю наявності пухлинного процесу, а також розглядають як показник можливого ураження лімфатичних вузлів хворих на РМЗ [24]. Відомо, що феритин продукується і секритується у кров гепатоцитами, макро-

фагами і пухлинними клітинами [25]. Підвищення концентрації феритину в сироватці крові пацієнтів із РМЗ корелює зі стадією пухлинного процесу і може частково відображати розвиток запалення за участю пухлиноасоційованих макрофагів [26]. Такі дані узгоджуються з результатами досліджень [27], які демонструють кореляцію рівнів феритину та сГЕПС при розвитку запального процесу, оскільки підвищення вмісту ГЕПС при розвитку запалення пов'язане з утилізацією заліза з макрофагів, що супроводжується системним дефіцитом цього мікроелемента та розвитком анемії.

Цікаві дані навели Т. Камаї та співавтори [7], які продемонстрували, що у хворих на поширений рак нирки визначалися вищі рівні сГЕПС-25 порівняно з пацієнтами без регіонарних і віддалених метастазів. Вони показали існування оберненої залежності між загальною виживаністю хворих та експресією мРНК ГЕПС у пухлинній тканині. В інших дослідженнях показано, що злоякісно трансформовані епітеліальні клітини товстої кишки характеризувалися експресією ГЕПС (34% ГЕПС+ клітин), при цьому рівень сГЕПС пацієнтів позитивно корелював зі стадією захворювання — рівень ГЕПС-25 значно підвищувався зі збільшенням стадії. Існує припущення, що підвищена експресія пГЕПС при колоректальному раку може бути пов'язана з IL-6. Це пояснюється тим, що основним індуктором ГЕПС є IL-6, експресія якого сильно виражена в тканинах раку прямої кишки та позитивно корелює зі стадією захворювання. Порушення регуляції експресії ГЕПС на рівні пухлини може бути складовою механізмів, які в кінцевому рахунку відповідають за канцерогенез [28].

Таким чином, як свідчать дані літератури, розвиток пухлинних процесів молочної залози, печінки, товстої кишки, а також нирки супроводжується порушеннями регуляції ГЕПС як на рівні пухлини, так і на рівні організму. Механізм таких порушень досить складний і остаточно не встановлений. Для клінічної картини онкологічного захворювання мають значення факти, які свідчать, що експресія мРНК пГЕПС стимулює їх метастатичний потенціал, тоді як білок ізоформи ГЕПС-25 діє системно при прогресуванні злоякісного процесу [29]. Результати подальших комплексних клінічних та молекулярно-біологічних досліджень у цьому напрямі можуть стати підґрунтям твердження, що підвищення експресії мРНК ГЕПС та високий рівень сГЕПС-25 можуть бути використані як маркери злоякісного росту та процесів метастазування.

Молекулярні механізми регуляції експресії ГЕПС досі повністю не з'ясовані, але є деякі відомості про його транскрипційну регуляцію [30]. Зокрема, вивчення поліморфізму генів, які відповідають за метаболізм заліза у людини, а також експериментальні дослідження на трансгенних мишах надають цінну інформацію про молекули, що беруть участь у регуляції ГЕПС, та про шляхи їх взає-

модії. Показано, що мутації у генах, що кодують рецептор трансферину 2 (transferrin receptor 2 — TfR2), гемоювелін (hemojuvelin — HJV) та низка інших білків (табл. 6) призводять до зниження спорідненості ГЕПС із залізом або ж до повної зупинки його функціонування. У цілому, мутації у вказаних регуляторних молекулах призводять або до розвитку дефіциту ГЕПС внаслідок переважанню організму залізом, або, навпаки, до надлишкової експресії цього білка через зв'язування заліза та зниження його вмісту в організмі. Отже, роль білків у складному і поки що мало вивченому питанні, що стосується регуляції ГЕПС при онкологічній патології, стоїть на порядку денному багатьох клінічних та експериментальних досліджень.

Таблиця 6

Гіпотетична роль ряду білків у регуляції обміну заліза за участю ГЕПС [30]

Білки	Гіпотетична роль
Transferrin (трансферин)	Переносник заліза, передає позаклітинне залізо гепатоцитам
TfR1 (рецептор трансферину 1)	Контролює рівень клітинного заліза
TfR2 (рецептор трансферину 2)	Контролює насичення трансферину залізом
Білок гемохроматозу людини (кодується геном <i>HFE</i> )	Зв'язування TfR1 і TfR2, сигналізує про зв'язок TfR1 з молекулою трансферину
BMP6 (bone morphogenetic protein 6 – кістковий морфогенетичний протеїн 6)	Залізоспецифічний ліганд рецептора BMP, його експресія посилюється у відповідь на підвищення вмісту заліза у печінці
Neogenin (неогенін)	Зв'язує гемоювелін, підсилює передачу сигналів за участю білків родини BMP
TMPRSS6 (трансмембранна серинпротеаза 6)	Знижує передачу сигналів за участю білків родини BMP шляхом розщеплення гемоювеліну
Smad4 (печінкоспецифічний Smad- та Mad-зв'язаний білок 4)	Передає сигнал BMP транскрипційному комплексу ГЕПС
HJV (hemojuvelin – гемоювелін)	Корецептор BMP, підсилює передачу сигналів за участю білків родини BMP, мішень – TMPRSS6

Таким чином, все наведене чітко вказує на складний механізм регуляції заліза за участю ГЕПС. Рівень такого показника обміну заліза, як ГЕПС, може бути важливою і необхідною складовою для оцінки загального стану організму, особливостей обміну білків, що беруть участь у метаболізмі заліза при різних патологічних процесах, особливо за умов ініціації та прогресування злоякісного росту у молочній залозі людини, а також предикативним маркером при поглибленій оцінці молекулярних підтипів РМЗ.

## ВИСНОВКИ

1. Результати дослідження свідчать про значну варіабельність концентрації сГЕПС у хворих на РМЗ, що вказує на можливість використання сГЕПС у ролі індивідуального показника порушення метаболізму заліза у пацієнтів з цією патологією.

2. Встановлено пряму кореляцію показників концентрації сГЕПС та експресії пГЕПС зі стадією

захворювання (відповідно  $r = 0,58$  і  $r = 0,28$ ), молекулярним (базальним) підтипом РМЗ (відповідно  $r = 0,42$  і  $r = 0,26$ ); експресії пГЕПС — зі ступенем диференціювання (G3) пухлини ( $r = 0,34$ ) та наявністю метастазів у РЛВ ( $r = 0,38$ ); концентрації сГЕПС — зі гістологічною будовою пухлини ( $r = 0,41$ ). Сукупність визначених кореляцій може свідчити про патогенетичний зв'язок між показниками сГЕПС і пГЕПС зі ступенем злоякісності РМЗ.

3. У хворих на РМЗ з анемією встановлено тенденцію до підвищення експресії пГЕПС, достовірно вищі показники сГЕПС, обернену помірну кореляцію між концентрацією сГЕПС та рівнем гемоглобіну ( $r = -0,50$ ), що свідчать про роль ГЕПС у розвитку анемії у хворих на РМЗ.

4. Оцінка змін показників сГЕПС та пГЕПС за їх асоціацією з клініко-морфологічними та молекулярно-біологічними критеріями пухлинного процесу у молочній залозі дозволяє глибше розкрити біологічну суть змін ГЕПС як одного з важливих маркерів гомеостазу заліза для розуміння ролі його порушень при виникненні та прогресуванні пухлинного процесу. Одержані результати можуть бути використані для системної оцінки стану гомеостазу заліза у хворих на РМЗ.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. DeSantis CE, Bray F, Ferlay J, Lortet-Tieulent J. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015; **24** (10): 1495–506.
2. Ludwig H, Muldur E, Endler G, et al. High prevalence of iron deficiency across different tumors correlates with anemia, increases during cancer treatment and is associated with poor performance status. *Haematologica* 2011; **96**: (Suppl 2): 409.
3. Луговой СП, Лубянова ИП, Клименко ПП. Особенности метаболизма железа и его роль в процессах канцерогенеза. *Укр журн проблем мед праці* 2013; **2** (35): 55–63.
4. Чехун СВ, Лук'янова НЮ, Собченко СО та ін. Зв'язок сироваткового та пухлинного феритину з клініко-морфологічними характеристиками та молекулярним типом пухлин у хворих на рак молочної залози. *Онкологія* 2014; **16** (4): 275–82.
5. Ganz T, Nemeth E. Hcpidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1823** (9): 1434–43.
6. Pusatcioglu CK, Nemeth E, Giamila Fantuzzi, et al. Systemic and tumor level iron regulation in men with colorectal cancer: a case control study. *Nutr Metab (Lond)* 2014; **11**: 21.
7. Kamai T, Tomosugi N, Abe H, et al. Increased serum hepcidin-25 level and increased tumor expression of hepcidin mRNA are associated with metastasis of renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2009; **9**: 270.
8. Orlandi R, Bortoli M De, Ciniselli CM. Hcpidin and ferritin blood level as noninvasive tools for predicting breast cancer. *Ann Oncol* 2014; **25** (2): 352–7.
9. Winand FJ, Boegemann M, Gallitz I, et al. GDF15 and hepcidin as prognostic factors in patients with prostate cancer. *J Mol Biomark Diagn* 2014; **5** (6): 199.
10. Лук'янова НЮ, Яловенко ТМ, Чехун ВФ. Особливості експресії гепсидину у хворих на рак молочної залози. *Онкологія* 2015; **17** (4): 258–62.
11. Чехун ВФ, Яловенко ТН, Павлова АА, Лук'янова НЮ. Клиническое значение уровня металлосодеждающих белков



в сыворотке крови больных раком молочной железы. Онкол журн 2016; 2 (38): 7–13.

12. Яловенко ТМ. Прогностичне значення пухлинного та сироваткового гепсидину у хворих на рак молочної залози. Матеріали науково-практичної конференції молодих вчених «Перспективи діагностики та лікування онкологічної патології». Клин онкол 2016; 2 (22): 80.

13. Rodgers GM, Becker PS, Blinder M. Cancer- and chemotherapy-induced anemia. J Natl Compr Canc Netw 2012; 10: 628–53.

14. Guido D. Role of hepcidin in the pathophysiology and diagnosis of anemia. Blood Res 2013; 48 (1): 10–15.

15. Coyne DW. Hepcidin: clinical utility as a diagnostic tool and therapeutic target. Kidney Int 2011; 80 (3): 240–4.

16. Ganz T, Olbina G, Girelli D, et al. Immunoassay for human serum hepcidin. Blood 2008; 112 (10): 4292–7.

17. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. Lancet Oncol 2012; 13 (1): 33–42.

18. Choi CH, Kang H, Kim WY, et al. Prognostic value of base line lymphocyte count in cervical carcinoma treated with concurrent chemoradiation. Int J Radiat Biol Phys 2008; 71 (1): 199–204.

19. Guido D. Role of hepcidin in the pathophysiology and diagnosis of anemia. Blood Res 2013; 48 (1): 10–15.

20. Kerkhoff AD, Meintjes G, Burton R, et al. Relationship between blood concentrations of hepcidin and anemia severity, mycobacterial burden, and mortality among patients with HIV-associated tuberculosis. J Infect Dis 2016; 213 (1): 61–70.

21. Sun Y, Liang F, Cao W, et al. Prognostic value of differentiated clusters in invasive breast cancer. World J Surg Oncol 2014; 12: 310.

22. Pan XT, Lu Y, Cheng X, et al. Expression and significance of hepcidin, lps and il-6 in the patients with cancer-related anemia. J Mod Lab Med 2012; 1: 55–7.

23. Orlandi R, Bortoli M De, Ciniselli C M. Hepcidin and ferritin blood level as noninvasive tools for predicting breast cancer. Ann Oncol 2014; 25: 352–7.

24. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, et al. Ferritin for the clinician. Blood Rev 2009; 23: 95–104.

25. Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A, et al. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. Blood 2010; 116: 1574–84.

26. Alkhateeb AA, Leitzel K, Ali SM, et al. Elevation in inflammatory serum biomarkers predicts response to trastuzumab-containing therapy. PLoS One 2012; 7: e51379.

27. Mecklenburg I, Reznik D, Fasler-Kan E, et al. Serum hepcidin concentrations correlate with ferritin in patients with inflammatory bowel disease. J Crohns Colitis 2014; 8: 1392–7.

28. Ward DG, Roberts K, Brookes MJ, et al. Increased hepcidin expression in colorectal carcinogenesis. World J Gastroenterol 2008; 14: 1339–45.

29. Fargion S, Valenti L, Fracanzani AL. Role of iron in hepatocellular carcinoma. Clin Liver Dis 2014; 3 (5): 108–10.

30. Ganz T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. Blood 2011; 117 (17): 4425–33.

## CHANGES OF HEPCIDIN CONCENTRATIONS IN SERUM AND ITS EXPRESSION IN TUMOR CELLS DEPENDING ON THE CLINICO-PATHOLOGICAL FEATURES OF BREAST CANCER

T.M. Yalovenko, N.Y. Lukianova, V.F. Chekhun

**Summary. Objective:** to determine the hepcidin (HEPC) concentration in serum and its expression in tumor cells depending on the clinico-pathological features of breast cancer and analysis of the sHEPC and tHEPC communication with the presence of anemia in patients with breast cancer. **Object and methods:** samples of operational material and samples of blood serum of 65 patients with breast cancer stage I–II (including 18 patients with anemia) aged 23 to 89 years. General clinical, histological, immunohistochemical, ELISA and statistical methods. **Results:** significant variability was shown in the concentration of sHEPC in patients with breast cancer, indicating the use sHEPC as an individual indicator of iron distortion metabolism in breast cancer patients. The data shows the correlation between sHEPC levels and tHEPC expression in breast cancer patients with stage II and histological structure. tHEPC expression in the tumor cells directly correlates with the metastatic lesion of regional lymph nodes and a low degree of differentiation of breast cancer. Special characteristics of sHEPC and tHEPC depending on the molecular subtype of breast cancer were determined. A direct correlation between the sHEPC concentration and anemia as also reverse correlation with the level of hemoglobin in patients with breast cancer was demonstrated. **Conclusions:** the given data reflect the importance role of HEPC in the progression of malignant disease and its association with more aggressive forms of breast cancer (basal molecular subtype) that gives grounds to consider sHEPCs and tHEPCs as diagnostic markers of iron disorders homeostasis under the manifestation of breast cancer, including patients with anemia.

**Key Words:** breast cancer, hepcidin, molecular subtype of breast cancer, malignancy, anemia, hemoglobin.

**Адреса для листування:**

Лук'янова Н.Ю.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України  
E-mail: lu\_na\_u@rambler.ru

Одержано: 23.08.2016