

Д.О. Шапочка  
С.П. Залеток  
М.І. Гнидюк

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

Івано-Франківський обласний  
онкологічний диспансер, Івано-  
Франківськ, Україна

**Ключові слова:** рак молочної  
залози, рецептори стероїдних  
гормонів, Her2/neu, NF-kB,  
молекулярний профіль пухлини.

## ЕКСПРЕСІЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МАРКЕРІВ (NF-kB, ER, PR, HER2/ NEU) В ПУХЛИНАХ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

**Резюме.** Проаналізовано рівень експресії субодиниць фактора транскрипції NF-kB (p50 та p65), рецепторів стероїдних гормонів (ER та PR) й епідермального фактора росту (Her2/neu) в пухлинній тканині 62 хворих на рак молочної залози. Виявлено обернену кореляцію рівня експресії рецепторів стероїдних гормонів зі ступенем диференціювання (Grade) пухлин, а також з рівнями експресії p50 та p65 NF-kB. Встановлено, що найвищий рівень експресії обох субодиниць NF-kB виявляється в пухлинах молекулярного підтипу Her2+. Отримані дані можуть опосередковано свідчити про поганий прогноз та хіміорезистентність пухлин з активованим NF-kB, однак це потребує подальших досліджень і ретроспективного аналізу великої вибірки пацієнтів.

### ВСТУП

Рак молочної залози (PMЗ) є найчастішим онкологічним захворюванням у жінок та основною причиною смертності жінок віком 35–55 років. Незважаючи на вдосконалення схем лікування, загальна 5-річна виживаність значно залежить від стадії захворювання; за даними Національного канцер-реєстру України, вона становила за період 2000–2005 рр. 56,2% в Україні та 88,0% в США [1].

До важливих прогностичних факторів традиційно відносять такі клінічні характеристики, як вік, менструальний статус, розмір пухлини, статус лімфовузлів, а також морфологічні характеристики пухлини (гістологічний тип, ступінь диференціювання, інвазія лімфатичних та кровоносних судин). В останні десятиріччя розуміння біології пухлини було значно поглиблене молекулярно-біологічними дослідженнями, результати яких дали змогу включити до клінічних факторів прогнозу перебігу захворювання й молекулярні особливості пухлинних клітин. Більшість молекулярно-біологічних маркерів, що сьогодні вивчаються, залучені до процесів, які в сукупності визначають здатність клітини до злоякісного росту [2]. Першими предиктивними молекулярно-біологічними маркерами для PMЗ стали рецептори естрогенів (estrogen receptor — ER) та прогестерону (progesterone receptor — PR). Хворі з позитивним статусом цих рецепторів здебільшого мають високу чутливість до гормональної терапії. Слідом за рецепторами стероїдних гормонів у клінічну практику увійшов рецептор епідермального фактора росту Her2/neu, позитивний статус якого у хворих на PMЗ корелює з високою чутливістю до таргетної терапії трастузумабом. Застосування даних маркерів у клінічній практиці сприяло індивідуалізації лікування та призначенню адекватних хіміотерапевтичних режимів. Однак 25–50% пухлин з позитивним статусом ER та PR нечутливі до гормональної терапії [3], а пухлини з гіперекспресією Her2/neu не завжди

відповідають на терапію трастузумабом. До того ж залишається біля 20% пацієнтів з тричі негативним раком (ER-PR-Her2/neu), для яких на даний час не встановлено мішеней для спрямованої терапії; для таких пухлин характерна підвищена резистентність до традиційних схем терапії.

Перспективними потенційними мішенями можуть бути фактори транскрипції, які, впливаючи на транскрипцію онкогенів, можуть відігравати важливу роль у формуванні хіміо- та радіорезистентності. До таких факторів, порушення функціонування яких часто має місце в злоякісних пухлинах, відносять ядерний фактор транскрипції NF-kB (nuclear factor kappa B). Родина NF-kB складається з поліпептидів c-rel, p50, p52, p65 (RelA), p68 (RelB), p100 та p105, що належать до так званої I $\kappa$ B-родини білків, гомологічних продукту онкогену *v-rel*. Найкраще з них досліджено p50 та p65, що формують класичний гетеродимер NF-kB. У більшості клітин NF-kB знаходиться в цитоплазмі в неактивному стані внаслідок зв'язування з інгібіторними білками класу I $\kappa$ B. У ході активації NF-kB під дією різноманітних індукторів відбувається фосфорилювання I $\kappa$ B, після чого він убіквітинується і гідролізується протеїназним комплексом, а вільний NF-kB транслокується в ядро, де зв'язується з відповідними ДНК-последовностями (NRE) і впливає на транскрипцію багатьох генів. Вперше NF-kB був описаний як білок, що специфічно зв'язується з последовністю позитивного регулятора гена легкого ланцюга к імуноглобулінів [4–6]. Цілою низкою досліджень було встановлено дуже важливу роль NF-kB у формуванні імунної відповіді. Пізніше було виявлено, що білки NF-kB залучені у процеси пухлинного росту. Для багатьох пухлин характерна конститутивна активність NF-kB [7]. Численні сучасні дані вказують на важливу роль NF-kB в підтриманні життєздатності пухлинних клітин. Другим важливим моментом є вплив NF-kB на чутливість пухлини до хіміотерапії та на імунні реакції організму

[8]. Так, було показано, що лише 20% хворих на РМЗ з активованим NF-κB відповідали на хіміотерапію, окрім цього в частині випадків рівень NF-κB в ядрах пухлинних клітин підвищувався після терапії, що, на думку С. Montagut та співавторів, може бути причиною формування хіміорезистентності [9].

Окрім безпосереднього зв'язку між активацією NF-κB та хіміорезистентністю, при РМЗ вивчається взаємозв'язок експресії NF-κB з експресією інших маркерів. Існує багато протиріч у результатах таких досліджень, пов'язаних як з відсутністю стандартного методу визначення активації NF-κB, так і з відмінностями в інтерпретації результатів, отриманих одним і тим самим методом. Однак більшість результатів свідчать, що NF-κB активується насамперед в ER-негативних та Her2/neu-позитивних пухлинах [9–12]. Такі пухлини молочної залози зазвичай мають високий Grade і проліферативний індекс та формують групу з найгіршим прогнозом та високою хіміорезистентністю. Ці дані опосередковано також свідчать на користь впливу NF-κB на чутливість пухлини до терапії. Усе це вказує, що перспектива безпосередньо регулювати активність NF-κB відкрила б нові можливості в терапії хворих з пухлинами [13].

Метою роботи було вивчення рівня експресії в тканині РМЗ p50 та p65 NF-κB у взаємозв'язку з експресією рецепторів стероїдних гормонів, Her2/neu та молекулярним підтипом пухлини.

## ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні використано зразки пухлин 62 пацієнток віком від 25 до 75 років (середній вік — 57 років) з РМЗ, які перед хірургічним видаленням пухлини не отримували променевої та хіміотерапії. Усі досліджені пухлини за морфологічною будовою належали до інвазивних протокових карцином із різним ступенем диференціювання (Grade). Клінічні дані та характеристика пухлин наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Клінічні дані та морфологічна характеристика пухлин

Характеристика	n	%
<b>Стадія РМЗ</b>		
I	4	6,4
II	40	64,5
III	7	11,3
IV	2	3,2
"X"	9	14,5
<b>Наявність метастазів в лімфатичних вузлах</b>		
+	33	53,2
-	29	46,8
<b>Ступінь диференціювання (Grade)</b>		
1	8	12,9
2	32	51,6
3	16	25,8
"X"	6	9,7

Рівень експресії молекулярно-біологічних маркерів: ER та PR, Her2/neu, субодиниць NF-κB (p50 і p65) — визначали імуногістохімічним методом. Для дослідження брали зрізи фіксованої у формаліні, залитої в парафін тканини товщиною 4 мкм. Демаскування антигенів проводили за температури 98°C протягом 30 хв. Для блокування ендогенної пероксидази зрізи протягом 5 хв інкубували з 0,03% пе-

рекісом водню. Після промивки зрізи 30 хв інкубували з первинними антитілами: Estrogen Receptor α (Monoclonal Rabbit Anti-Human, RTU, clone SP1, Dako), Progesterone Receptor (Monoclonal Mouse Anti-Human, RTU, clone PgR 636, Dako), c-erbB2 (Polyclonal Rabbit Anti-Human, 1:1000, Dako), NF-κB p50 (NLS) (Polyclonal Rabbit Anti-Human, 1:200, sc114, Santa Cruz Biotechnology), p-NF-κB p65 (Ser 536) (Polyclonal Rabbit Anti-Human, sc-33020, Santa Cruz Biotechnology), Cytokeratin 5/6 (Monoclonal Mouse Anti-Human, RTU, clone D5/16 B4). Після цього 20 хв інкубували з полімером HRP візуалізаційної системи FLEX (Dako). Після чергової промивки наносили на 3 хв DAB і контрастували ядра гематоксиліном Майєра.

Для інтерпретації імуногістохімічної реакції з антитілами проти ER, PR, p65 та p50 застосовували метод H-score. Рівень експресії визначали за формулою:

$$H = 3 \times \text{процент інтенсивно заб. ядер} + 2 \times \text{процент помірно заб. ядер} + 1 \times \text{процент слабо заб. ядер}$$

При значеннях  $H > 100$  рівень експресії маркера вважали високим (3+), від 50 до 99 — середнім (2+) і при  $H < 50$  — низьким (1+).

Для інтерпретації реакції з антитілами проти Her2/neu (c-erbB2) застосовували такі критерії: 0 — відсутність забарвлення; 1+ — слабе неповне пофарбування мембрани пухлинних клітин; 2+ — середня інтенсивність пофарбування мембрани більше 10% пухлинних клітин; 3+ — інтенсивне пофарбування мембрани більше 10% пухлинних клітин. Пухлини з рівнем експресії 0 та 1+ вважали Her2/neu-негативними, а з 2+ та 3+ — позитивними.

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

Статистичний аналіз отриманих даних проводили за допомогою програми SPSS, визначаючи коефіцієнт кореляції Пірсона, а для перевірки її достовірності застосовували критерій «хі-квадрат»  $\chi^2$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відомості про експресію досліджених молекулярних маркерів у хворих на РМЗ наведено в табл. 2. Виявлено, що у 47 пацієнток (76%) були ER-позитивні ( $HER = 10-300$ ) пухлини, у 15 (24%) — ER-негативні ( $HER < 10$ ). Пухлини 42 пацієнток (68%) були PR-позитивні ( $HPR = 10-300$ ), 20 (32%) — PR-негативні ( $HPR < 10$ ). У 25 випадках (40%) було виявлено гіперекспресію Her2/neu (2+, 3+), у 37 (60%) — пухлини мали негативний Her2/neu-статус (0; 1+). При дослідженні експресії субодиниць NF-κB високі рівні p50 ( $Hp50 = 100-300$ ) та p65 ( $Hp65 = 100-300$ ) в пухлинах знайдено відповідно у 39 (63%) та 7 (11%) зразках, у той час як в інших зразках рівень експресії був

низький ( $Hr50 < 100$ ,  $Hr65 < 100$ ). Слід зазначити, що для всіх пухлин з високим рівнем експресії p65 характерним був високий рівень і p50.

Таблиця 2

Експресія молекулярних маркерів в пухлинах хворих на РМЗ		
Статус маркера	n	%
<b>ER</b>		
-	15	24
+	47	76
<b>PR</b>		
-	20	32
+	42	68
<b>Her2/neu</b>		
-	37	60
+	25	40
<b>Рівень експресії p65</b>		
Низький	55	89
Високий	7	11
<b>Рівень експресії p50</b>		
Низький	23	37
Високий	39	63

За молекулярним профілем пухлини було розподілено згідно з класифікацією David J. Dabbs [14] (табл. 3). Так, пухлини з високим рівнем експресії ER ( $HER > 100$ ) та негативним Her2/neu-статусом (0; 1+) незалежно від рівня експресії PR відносили до люмінального А підтипу. Пухлини з негативним Her2/neu-статусом і низьким/середнім рівнем експресії ER ( $HER: 10-100$ ) або з негативним ER-статусом при позитивній експресії PR відносили до люмінального В підтипу. Базальноподібний підтип становили пухлини з негативним Her2/neu-статусом та негативною або дуже низькою експресією ( $H < 10$ ) ER і PR. СК5/6+ пухлини відносили до тричі негативних базальних, а СК5/6- — до тричі негативних небазальних. Пухлини з позитивним Her2/neu-статусом (2+, 3+) та негативною або дуже низькою експресією ER і PR відносили до Her2/neu+-підтипу. Решту пухлин з позитивним статусом ER, PR та Her2/neu відносили до гібридного люмінального А/Her2/neu+ або люмінального В/Her2/neu+-підтипу залежно від рівня експресії ER та PR. Через обмеженість вибірки пацієнтів ( $n=62$ ) для статистичного аналізу були об'єднані підтипи пухлин, що мають незначну різницю в прогнозі перебігу захворювання: люмінальний А та В — до люмінального; тричі негативний базальний та небазальний — до базальноподібного; гібридний люмінальний А/Her2/neu+ та В/Her2/neu+ — до гібридного люмінального/Her2/neu+. Отже, після об'єднання розподіл пухлин по підтипах був наступний: пухлини 25 пацієнтів (40%) належали до люмінального підтипу; 12 (20%) — до базальноподібного; 7 (11%) — до Her2/neu-позитивного; 18 (29%) — до гібридного (люмінального/Her2/neu+) (див. табл. 3).

При вивченні взаємозв'язку між клініко-морфологічними характеристиками пухлин та експресією в них молекулярно-біологічних маркерів виявлено обернену кореляцію між ступенем диференціювання пухлини (Grade) та експресією ER ( $r = -0,999$ ,  $p < 0,05$ ) і PR ( $r = -0,964$ ,  $p = 0,086$ ) (рис. 1). Інакше кажучи, збільшення Grade в пухлині корелює зі зниженням рівня експресії рецепторів стероїдних гормонів (ER та PR), що узгоджується з літературними даними [15].

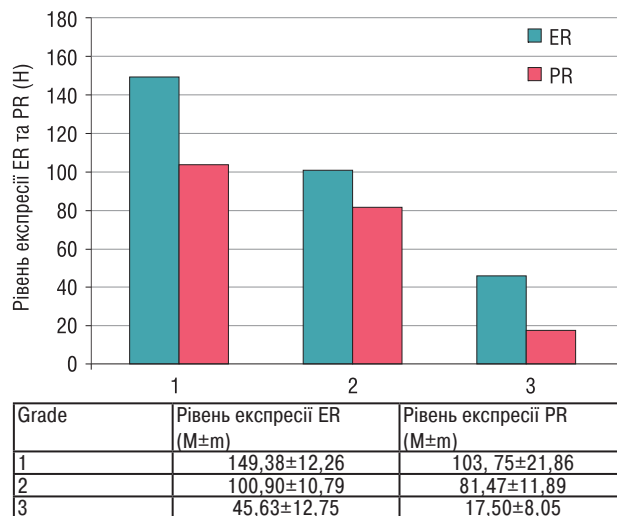


Рис. 1. Взаємозв'язок між ступенем диференціювання пухлини (Grade) та експресією рецепторів стероїдних гормонів (ER та PR)

Кореляційної залежності експресії досліджуваних маркерів з клінічними характеристиками (вік, стадія, ураження аксиллярних лімфовузлів) виявлено не було.

У переважній більшості пухлин з високими рівнями експресії p50 та p65 була відсутня або дуже низька експресія ER (у 5 з 7) та PR (у 6 з 7), хоча частка ER- та PR-пухлин у вибірці становить відповідно 24 та 32%. Для вивчення кореляційного зв'язку експресії цих маркерів з профілем експресії NF-kB ми розділили пацієнтів на 3 групи: I — з високим рівнем ядерної експресії p65 та p50; II — з високим рівнем p50 та низьким p65; III — з низьким рівнем обох субодиниць NF-kB. Виявлено обернену кореляцію між експресією субодиниць NF-kB та експресією рецепторів стероїдних гормонів (ER:  $r = -1,0$ ,  $p < 0,01$ ; PR:  $r = -0,999$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 2). Було виявлено також обернену кореляцію між експресією рецепторів стероїдних гормонів і експресією p50 (для ER:  $r = -0,991$ ,  $p < 0,05$ ; для PR:  $r = -0,998$ ,  $p < 0,05$ ). Достовірної кореляції між експресією згаданих рецепторів та експресією p65 не виявлено.

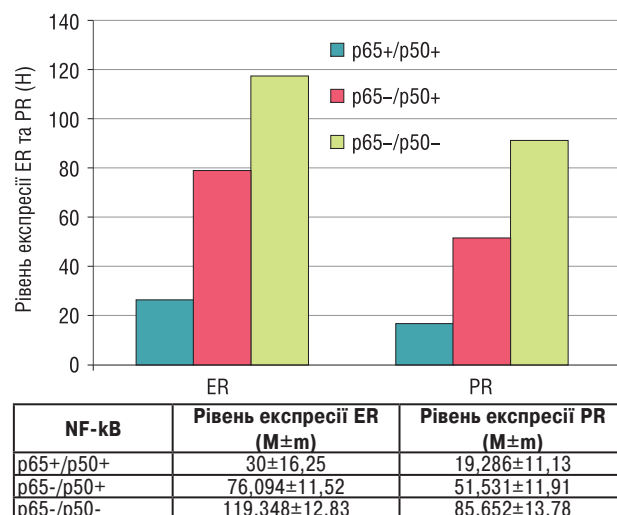


Рис. 2. Кореляція між експресією субодиниць NF-kB та рецепторів стероїдних гормонів (ER і PR)



Проаналізовано зв'язок між експресією субодиниць NF- $\kappa$ B та молекулярним підтипом пухлини (рис. 3). Виявлено, що ядерна експресія субодиниць NF- $\kappa$ B ( $p50$ :  $r=0,917$ ,  $p<0,05$ ;  $p65$ :  $r=0,974$ ,  $p<0,05$ ) збільшується у напрямку: гібридний  $\rightarrow$  люмінальний  $\rightarrow$  базальноподібний  $\rightarrow$  Her2/neu-позитивний підтип. Ці результати дещо суперечать даним літератури [9–12], згідно з якими найнижчий рівень експресії NF- $\kappa$ B спостерігається в люмінальному підтипі, що може бути пояснено невеликою вибіркою пацієнтів та об'єднанням підтипів пухлин (див. таб. 3).

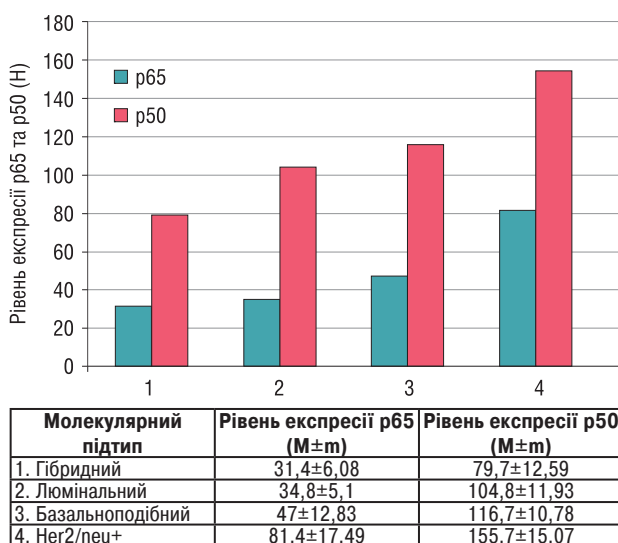


Рис. 3. Кореляція між молекулярним профілем пухлини і експресією субодиниць NF- $\kappa$ B

Щодо взаємоз'язку між експресією NF- $\kappa$ B та іншими молекулярними та клініко-морфологічними особливостями РМЗ дані в літературі суперечливі, праць із дослідження цього питання небагато. Згідно з нашими результатами найвищі рівні NF- $\kappa$ B виявлено в Her2/neu+ та базальноподібному підтипах пухлин, які пов'язані з поганим прогнозом. Збільшення ядерної експресії субодиниць NF- $\kappa$ B корелює зі зниженням рівня експресії рецепторів стероїдних гормонів (ER та PR), що в свою чергу також погіршує прогноз перебігу захворювання. Ці результати узгоджуються з даними літератури щодо хіміорезистентності пухлин з позитивним статусом p65 [9].

## ВИСНОВКИ

1. Виявлено обернену кореляцію рівня експресії ER та PR зі ступенем диференціювання (Grade) пухлин, що узгоджується з даними літератури.

2. Встановлено обернену кореляцію між профілем експресії NF- $\kappa$ B та рівнем експресії рецепторів стероїдних гормонів (ER, PR).

3. Встановлено, що найвищий рівень ядерної експресії субодиниць NF- $\kappa$ B ( $p50$  та  $p65$ ) виявляється в базальноподібному та Her2/neu-позитивному підтипах РМЗ.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Рак в Україні, 2008–2009: Захворюваність, смерність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцерреєстру України, Київ, 2010; (11): 5.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; **100**: 57–70.
3. Klijn JGM. Clinical parameters and symptoms for the progression to endocrine independence of breast cancer. In: Mechanisms of Progression to Hormone-independent Growth of Breast and Prostatic Cancer. Carnforth: The Parthenon Publishing Group, 1991: 11–9.
4. Sen R, Baltimore D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986; **46**: 705–16.
5. Sen R, Baltimore D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. Cell 1986; **47**: 921–8.
6. Leonardo M, Pierce JW, Baltimore D. Protein-binding sites in Ig gene enhancers determine transcriptional activity and inducibility. Science 1987; **236**: 1537–77.
7. Meteoglu I, Erdoglu IH, Meydan N, et al. NF-kappaB expression correlates with apoptosis and angiogenesis in clear cell renal cell carcinoma tissues. J Exp Clin Cancer Res 2008; **27**: 53.
8. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS. Tnf- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. Science 1996; **274**: 784–7.
9. Montagut C, Tusquets I, Ferrer B, et al. Activation of nuclear factor-kB is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Endocrine-Related Cancer 2006; **13** (2): 606–16.
10. Zhou BP, Hu MC, Miller SA, et al. HER-2/neu blocks tumor necrosis factor-induced apoptosis via the Akt/NF-kB pathway. J Biol Chem 2000; **275** (11): 8027–31.
11. Biswas DK, Shi Q, Baily S, et al. NF-kB activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. Proc Nat Acad Sci (USA) 2004; **101** (27): 10137–42.
12. Герштейн ЕС, Щербаков АМ, Платова АМ и др. Экспрессия и ДНК-связывающая активность транскрипционного фактора NF-kB в опухолях больных раком молочной железы. Бюл экп биол мед 2010; (7): 80–4.
13. Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kB. J Clin Investigat 2001; **107** (3): 241–6.
14. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry: therapeutic and genomic applications, 3rd ed. Philadelphia: Saunders (Elsevier Science), 2010: 941 p.
15. Добренький МН, Добренький АМ. Молекулярно-биологические и биохимические факторы прогноза при раке молочной железы. Вест РНЦПР МЗ РФ 2005; 5.

Таблиця 3

Розподіл хворих на РМЗ за молекулярним профілем пухлини

Молекулярний підтип		Критерії належності до молекулярного підтипу	Кількість випадків n (%)	
Люмінальний	Люмінальний А [14]	ER 3+; Her2/neu 0: 1+	20 (32)	25 (40)
	Люмінальний В [14]	ER 1+, 2+; Her2/neu 0, 1+; або ER 0; PR $\geq$ 1+; Her2/neu 0: 1+	5 (8)	
Базальноподібний [16]	Тричі негативний базальний [14]	ER (H<10); PR (H<10); Her2/neu 0: 1+; CK5/6+	8 (13)	12 (20)
	Тричі негативний небазальний [14]	ER (H<10); PR (H<10); Her2/neu 0: 1+; CK5/6-	4 (7)	
Her2/neu-позитивний [14, 16]		ER (H<10); PR (H<10); Her2/neu 2+, 3+	7 (11)	
Гібридний	Люмінальний А/ Her2+ [14]	ER 3+; Her2 2+, 3+	12 (19)	18 (29)
	Люмінальний В/ Her2+ [14]	ER 1+, 2+; Her2 2+, 3+; або ER 0; PR $\geq$ 1+; Her2 2+, 3+	6 (10)	

16. Щепотин ИБ. Клинико-биологические особенности трижды негативного рака грудной железы. Клини онкол 2012; 5 (1): 55–8.

### EXPRESSION OF MOLECULAR MARKERS NF- $\kappa$ B, ER, PR, HER2/NEU IN TUMORS OF PATIENTS WITH BREAST CANCER

*D.O. Shapochka, S.P. Zaletok, M.I. Gnidyuk*

**Summary.** *The expression of transcription factor NF- $\kappa$ B (p50 and p65), ER, PR and Her2/neu in tumor tissue of 62 patients with breast cancer was investigated. As a result of researches the correlation between Grade and expression of hormone receptors (ER and PR) was defined. p50 and p65 levels were found to be changed in dependence from expression of each marker (ER and PR) and also from tumor's type (Luminal, Her2-posi-*

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ  
*tive, hybrid, basal-like). These data may indicate poor prognosis and resistance to chemotherapy in breast cancer patients with activated NF- $\kappa$ B, but it requires further research and retrospective analysis of large number of patients.*

**Key Words:** breast cancer, receptors of steroid hormones, Her2/neu, NF- $\kappa$ B, molecular profile.

**Адреса для листування:**

Шапочка Д.О.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

Інститут експериментальної патології,

онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького

НАН України

E-mail: shapochka.dm@gmail.com