

С.В. Чехун¹
 Н.Ю. Лук'янова¹
 С.О. Собченко²
 Т.В. Задворний¹
 Ю.В. Лозовська¹
 Л.Г. Бучинська¹
 Л.З. Поліщук¹

¹Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України

²Київський міський клінічний онкологічний центр, Київ, Україна

Ключові слова: рак молочної залози, молекулярний підтип, феритин.

ЗВ'ЯЗОК РІВНІВ СИРОВАТКОВОГО ТА ПУХЛИННОГО ФЕРИТИНУ З КЛІНІКО-МОРФОЛОГІЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ ТА МОЛЕКУЛЯРНИМ ТИПОМ ПУХЛИН У ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Мета: дослідити концентрацію феритину (ФЕР) у сироватці крові (СФЕР) хворих на рак молочної залози (РМЗ), її зв'язок з експресією ФЕР у пухлинних клітинах (ПК) залежно від клініко-патологічних особливостей, у тому числі від різних молекулярних підтипів, РМЗ. **Об'єкт і методи:** досліджено 151 хвору на РМЗ у I–II стадії, віком від 28 до 89 років (середній вік — $60,5 \pm 11,6$ року) з використанням клінічних, імуноферментних, морфологічних і статистичних методів. **Результати:** встановлено значне підвищення рівня СФЕР і ФЕР у ПК хворих із базальним підтипом РМЗ порівняно з люмінальним А і Б підтипами пухлин. Доведено існування прямого кореляційного зв'язку між рівнем СФЕР та експресією ФЕР у ПК хворих на РМЗ базального підтипу. Встановлено залежність показників ФЕР від віку хворих, гістологічної будови і ступеня диференціювання пухлини за відсутності залежності від стадії захворювання. **Висновок:** досліджені молекулярні підтипи РМЗ характеризуються значною гетерогенністю рівня сироваткового та пухлинного ФЕР; показники ФЕР можуть бути використані як додаткові маркери ступеня злоякісності та критерії прогнозу клінічного перебігу захворювання і чутливості РМЗ до медикаментозної терапії.

Протягом останнього 10-річчя рак молочної залози (РМЗ), який є найбільш розповсюдженою формою онкологічної патології у жінок в усьому світі, привертає до себе пильну увагу у зв'язку з появою все більшого обсягу інформації про патогенез та біологічні особливості пухлин. Проте, як свідчать дані літератури і клінічний досвід, індивідуальний прогноз захворювання не завжди може бути коректним через варіабельність клінічних проявів РМЗ на різних етапах його розвитку, яка зумовлена його інтра- та інтрапухлинною гетерогенністю за гістологічним типом (дуктальний, лобулярний та ін.) та типом росту (солідний, вугроподібний, папілярний, криброзний) [1, 2]. За даними літератури, в індивідуальних клінічних проявах РМЗ мають значення генетичні та молекулярні фактори (ДНК, мікроРНК) [3–5], які також можуть модулювати біологічні особливості пухлинних клітин (ПК), їхні потенції до росту і метастазування та чутливість до цитостатиків.

Встановлено різні патогенетичні форми хвороби та молекулярні підтипи РМЗ, які відрізняються за клінічним перебігом і темпами прогресування пухлинного процесу [6, 7]. Наразі прогноз клінічного перебігу РМЗ базується на підставі визначення не тільки гістологічної форми РМЗ, але і його молекулярного підтипу, зокрема люмінального А, люмі-

нального Б, базального, HER2/neu-позитивного [3]. Поряд з цим все більше накопичується даних, що такі молекулярні підтипи характеризуються різною відповіддю на терапію, неоднаковою схильністю РМЗ до метастазування у регіонарні лімфатичні вузли, різним рекурентним ризиком РМЗ — навіть у межах одного молекулярного підтипу [8, 9]. Тому актуальним є визначення допоміжних факторів, за якими можна було б судити детальніше про проліферативні чи інвазійні властивості ПК, або особливості метаболізму ПК різних молекулярних підтипів РМЗ.

На нашу думку, до факторів, які можуть мати зв'язок з клінічними особливостями РМЗ, можна віднести залізовмісні білки, задіяні у процесах проліферації клітин і прогресуванні пухлин та пов'язані з деякими біологічними характеристиками пухлинного росту і прогнозом пухлинного процесу. Існують дані літератури про біологічне значення заліза для розвитку судинного компонента пухлин, а деякі дослідники вважають залізовмісні білки у ПК молекулярними мішенями для цитостатиків [10–12]. У цьому аспекті надзвичайний інтерес викликають дослідження останніх років, в яких показана роль порушень обміну ендogenous заліза та активних форм кисню в реалізації цитотоксичних ефектів багатьох протипухлинних препаратів, у тому чис-

лі паклітакселу, цисплатину, етопозиду та доксорубіцину [12, 13].

Відомо, що негативні наслідки для організму в цілому може мати як дефіцит заліза, так і його надлишок. У процесі злоякісної трансформації надлишок заліза у клітинах сприяє утворенню активних форм кисню, які викликають пошкодження ДНК. Естрогени при цьому можуть виступати додатковим субстратом цих реакцій за рахунок приєднання гідроксильної групи та утворення катехолестрогену, який є одним із чинників гормонального канцерогенезу [14, 15].

За даними літератури, центральну роль у контролі гомеостазу заліза в організмі, а також у функціональній активності клітин, регуляції їх проліферації, клітинного циклу відіграє феритин (ФЕР) [16, 17, 20, 21]. ФЕР — це макромолекулярний комплекс, що складається з 24 субодиниць двох типів: Н (heavy) та L (light). Кожна тканина, залежно від фізіологічних функцій, містить певну кількість Н-та L-субодиниць у ФЕР. Основною функцією ФЕР є внутрішньоклітинне депонування заліза (4500 атомів заліза на молекулу ФЕР) у розчинній нетоксичній, але фізіологічно доступній для організму формі [22]. Крім того, Н-субодиниця ФЕР виконує функцію пероксидази, тобто окислює залізо з утворенням таких побічних продуктів, як активні форми кисню, H_2O_2 , що викликають у край небезпечні наслідки для клітини.

З погляду значення комплексності змін в організмі хворих на рак, важливою є інформація, що концентрація ФЕР у сироватці крові (СФЕР) хворих на РМЗ не тільки суттєво перевищує показники норми, але й корелює з підвищенням експресії ФЕР у пухлині та з наявністю віддалених метастазів, особливо при ураженні метастазами печінки [17]. Показано також, що концентрація СФЕР залежить від гістологічного типу пухлин, наприклад, вона підвищена (більше ніж у 10 разів) у хворих на набряково-інфільтративну форму РМЗ.

Концепцію стосовно такої важливої ролі залізовмісних білків у пухлинному рості підтверджено результатами наших попередніх досліджень. Показано, що в клітинах РМЗ базального молекулярного підтипу (MDA-MB-231 та MDA-MB-468) відзначається високий рівень ФЕР, підвищення рівня вільного заліза, активних форм кисню та супероксиддисмутази (СОД), а також зниження експресії мікроРНК 200b. Дослідженнями, проведеними нами на клінічному матеріалі, встановлено зв'язок рівня СФЕР і ФЕР у пухлинах з чутливістю до неоад'ювантної терапії та виживаністю хворих. Відзначені також кореляції між рівнем експресії ФЕР і такими показниками злоякісності РМЗ, як проліферація, рецепторний статус і туморогенність [23, 24].

Таким чином, на сьогодні існують беззаперечні докази значення ФЕР у прогресуванні РМЗ. З погляду системного характеру цього захворювання, за-

лишаються остаточно не з'ясованими питання щодо зв'язку змін рівня СФЕР і ФЕР у ПК хворих на РМЗ залежно від молекулярного підтипу.

Мета роботи — дослідити концентрацію СФЕР хворих на РМЗ, її зв'язок з експресією ФЕР у ПК залежно від клініко-патологічних особливостей пухлин, у тому числі від різних молекулярних підтипів РМЗ.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження ґрунтується на аналізі результатів обстеження 151 хворої на РМЗ у I–II стадії, які перебували на лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2013 року. Усі пацієнтки дали поінформовану згоду на участь у дослідженні та використання операційного матеріалу з дослідницькою метою. Стадію пухлинного процесу визначали згідно з Міжнародною класифікацією пухлин (TNM, 2002, 6-е видання). Гістологічний тип пухлин верифікували при морфологічному дослідженні зразків операційного матеріалу хворих за стандартною методикою (забарвлення гематоксиліном та еозином), використовуючи Міжнародну гістологічну класифікацію ВООЗ (2002 р.). Неоад'ювантну поліхіміотерапію (ПХТ) хворим не призначали. Усім пацієнткам проведено ад'ювантну ПХТ відповідно до стандартів лікування, прийнятих в Україні, за схемами FAC або AC з інтервалом 21 день, кількість курсів ПХТ — від 4 до 6. Після операції хворим проводили променеву терапію (ПТ) на післяопераційний рубець, пахову, парастеральну та надключичну ділянки (апарат «TERAGAM», разова вогнищева доза — 2 Гр, сумарна вогнищева доза — 40 Гр).

Концентрацію (рівень) СФЕР визначали за допомогою методу твердофазного імуоферментного аналізу (ELISA) із застосуванням відповідних наборів тест-систем: Human Ferritin Elisa, Abcam (UK) і Calbiotech (USA) й автоматичного біохімічного та імуоферментного аналізатора Chem Well 2990. Зразки сироватки крові для імуоферментного аналізу отримували до початку лікування згідно з рекомендаціями, зазначеними в інструкціях до наборів. Усі зразки сироватки не містили ознак гемолізу, були центрифуговані при 1500 об./хв та зберігалися за температури $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. У нормі в сироватці крові здорових людей рівень ФЕР коливається від 10 до 150 нг/мл.

Оцінку молекулярного підтипу РМЗ проводили у гістологічних зрізах (товщина 4 мікрони) парафінових блоків операційного матеріалу, які підлягали імуногістохімічному (ІГХ) дослідженню експресії рецепторів естрогенів (ER), прогестерону (PR), епідермального фактора росту типу 2 (Her2/neu), використовуючи MkAT antiER (клон 1D5), antiPR (клон PgR636), antiHER/2neu (клон c-erbB-2) (Dako Cytomation, Данія). Визначали кількість клітин із позитивною експресією маркерів, оцінюючи ступінь прояву ІГХ реакції: «+++» — сильний, «++» — помірний, «+» — низький або «0» — відсут-

ність експресії. На паралельних парафінових зрізах проводили ІГХ дослідження ФЕР у ПК. Як первинні антитіла використовували МкАТ, специфічні до ФЕР (клон ab75972, АТ Abscam, США). Для оцінки експресії ФЕР застосовували напівкількісний метод. Оцінку результатів проводили за допомогою оптичної мікроскопії ($\times 400$) з використанням класичного методу H-Score [21, 29]. Кінцевий результат обчислення виражали у балах за такою градацією: до 50 балів — відсутність експресії, 51–100 балів — низький рівень експресії, 101–200 балів — помірний, 201–300 балів — високий. Для візуалізації результатів усіх ІГХ реакцій використовували набір реактивів EnVision system (Dako LSAB2 system, Данія) відповідно до рекомендацій виробника, гістологічні зрізи забарвлювали гематоксиліном Мейєра.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням методів варіаційної статистики із застосуванням програми Statistica 6.0. Для оцінки достовірності відмінностей експресії досліджених маркерів залежно від клініко-патологічних характеристик РМЗ використовували коефіцієнт кореляції Пірсона (r). Достовірними вважали розбіжності при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За клінічними даними, вік хворих коливався від 28 до 89 років (середній вік $60,5 \pm 11,6$ року) (табл. 1). Найбільша частка хворих (55,0%) була у віковому інтервалі 51–70 років. Частка хворих віком до 30 років становила 0,7%, 30–40 років — 1,3%, 41–50 років — 20,5%, 71–89 років — 22,5%. У більшості пацієнток (80,8%) була менопауза.

Таблиця 1

Клінічні дані та характеристика пухлин хворих на РМЗ

Показник	Кількість хворих	
	n	%
Загальна кількість хворих	151	100
Вік хворих (років)		
Середній	$60,5 \pm 11,6$	
Коливання віку	28–89	
Менструальний цикл		
Збережений	29	19,2
Менопауза	122	80,8
Стадія РМЗ за TNM (категорія T)		
I	47	31,1
II	104	68,9
у тому числі T2a	81	53,6
T2b	23	15,3
Стадія РМЗ за TNM (категорія N)		
N0	109	72,2
N1	42	27,8
Гістологічний тип		
Інфільтративний дуктальний рак	101	66,9
Інфільтративний лобулярний рак	50	33,1
Ступінь диференціювання		
G1 (високий)	42	27,8
G2 (помірний)	78	51,7
G3 (низький)	31	20,5
Молекулярний підтип		
Люмінальний А	81	53,6
Люмінальний Б	35	23,2
Базальний	35	23,2

РМЗ у I стадії діагностовано у 31,1%, у II стадії — у 68,9% хворих. Метастатичні ураження регіонарних лімфатичних вузлів були у 42 (27,8%) пацієнток, віддалені метастази при комплексному (рентгенологічному, ультразвуковому, лабораторному) обстеженні хворих до хірургічного лікування не діагностовано.

Морфологічне дослідження операційного матеріалу показало, що частіше діагностували інфільтративний дуктальний (66,9%), ніж інфільтративний лобулярний (33,1%) РМЗ; при цьому у більшості хворих (51,7%) визначено помірний ступінь диференціювання пухлини.

При ІГХ дослідженні виділено три молекулярні підтипи РМЗ: люмінальний А (ER+, PR+, Her2/neu–), частота якого була найвищою, — 81 (53,6%); люмінальний Б (ER+, PR+, Her2/neu+) — 35 (23,2%); базальний підтип (ER–, PR–, Her2/neu–) — 35 (23,2%) випадків.

Аналіз рівня СФЕР показав його варіабельність. Він виявився вищим за референтний рівень у 101 (67,0%) пацієнтки. Середній показник СФЕР становив $180,7 \pm 28,9$ нг/мл, що достовірно перевищувало референтні значення ($p < 0,05$). Привертає увагу те, що у 16 (15,8%) зі 101 хворої з підвищеним рівнем СФЕР визначено перевищення верхньої межі норми майже вдвічі ($284,2$ нг/мл), а у деяких хворих показник СФЕР досягав ще більших значень ($387,2$ нг/мл). У 50 (33,1%) пацієнток рівень СФЕР не перевищував референтні показники і становив у середньому $135,4 \pm 9,6$ нг/мл.

Для вирішення питання стосовно залежності рівня СФЕР від віку пацієнток проведено зіставний аналіз індивідуальних показників. Як свідчать дані рис. 1, рівень СФЕР прогресивно підвищувався зі збільшенням віку хворих. Так, середній рівень СФЕР у хворих 28–50 років становив $153,7 \pm 18,7$ нг/мл, у пацієнток віком старше 50 років він підвищувався, у хворих з тривалою менопаузою (11–39 років) — статистично суттєво ($p < 0,05$) з індивідуальними коливаннями від 131,0 до 194,2 нг/мл.

У зв'язку з виявленою варіабельністю СФЕР становить інтерес аналіз результатів ІГХ дослідження експресії ФЕР у ПК. Виявилось, що у пухлинах 61 (40,4%) хворої експресія ФЕР була помірною та високою (у межах відповідно 101–200 та 201–300 балів), тоді як у 90 (59,6%) пацієнток вона не перевищувала 100 балів. Варіабельність даних стала підставою для порівняння кількості хворих із ФЕР-позитивними (ФЕР+) пухлинами залежно від вікових періодів. З'ясувалося, що кількість ФЕР+ пухлин у хворих віком 28–50 років становила 10 (16,4%), у віковому діапазоні 51–60 років збільшувалася до 13 (21,3%), а у хворих, старших 60 років, досягала 38 (62,3%) ($p < 0,05$). Тобто, кількість ФЕР+ пухлин була більшою в 3,8 раза у хворих віком 61–89 років і у 1,3 раза — у пацієнток віком 51–60 років, ніж у віковому інтервалі 28–50 років.

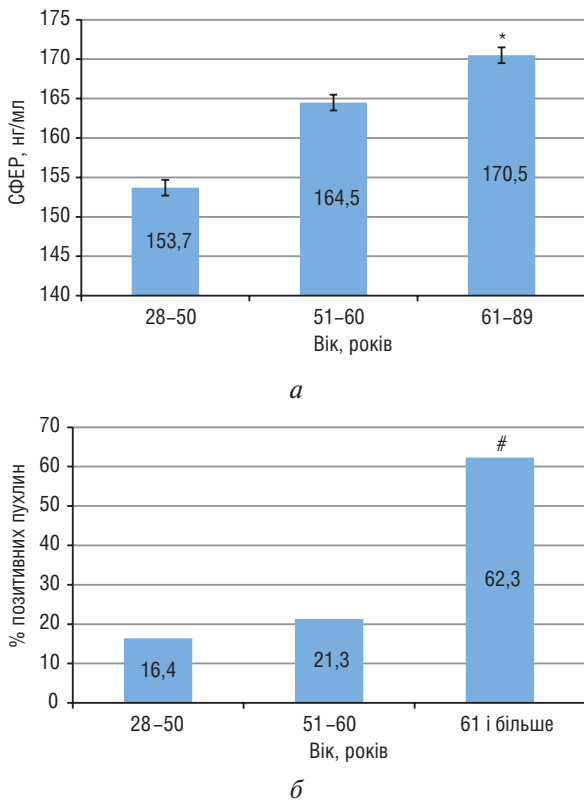


Рис. 1. Зміни рівня СФЕР (а) та частоти ФЕР+ пухлин (б) залежно від віку хворих на РМЗ.

Примітка: * $p < 0,05$ при порівнянні хворих віком 61–89 років із хворими вікового діапазону 28–50 років; # $p < 0,05$ при порівнянні хворих віком 61–89 років з іншими віковими діапазонами

Результати аналізу середніх показників СФЕР та кількості ФЕР+ пухлин залежно від стадії, гістологічного типу та ступеня диференціювання РМЗ відображено у табл. 2. Як свідчать дані, згадані показники не мають достовірних відмінностей залежно від стадії захворювання. Щодо залежності від гістологічного типу РМЗ, то помірну і високу експресію ФЕР у пухлині достовірно частіше спостерігали за наявності інфільтративного лобулярного раку по-

рівняно з інфільтративним дуктальним, хоча середні рівні експресії (H-Score, балів) у названих підгрупах практично не відрізнялися. Частота рівня СФЕР, вища за референтні значення, не залежала від гістологічного типу РМЗ. Аналіз рівня СФЕР залежно від ступеню диференціювання РМЗ показав, що серед хворих із високо- і помірно диференційованими пухлинами частота випадків підвищеного рівня СФЕР була достовірно нижчою, ніж у пацієнток із низьким ступенем диференціювання. За показниками експресії ФЕР у пухлинах із різним ступенем диференціювання достовірних відмінностей не виявлено (див. табл. 2).

Результати кореляційного аналізу одержаних даних подано в табл. 3, з якої видно, що не відзначено кореляції між рівнем СФЕР та експресією ФЕР у ПК зі стадією РМЗ, з наявністю дуктального раку, а також зі ступенями диференціювання G2–G3 (відносно рівня СФЕР) та G3 (відносно експресії ФЕР у ПК). Водночас встановлено позитивний зв'язок підвищення показників ФЕР з віком (на рівні тенденції) і наявністю РМЗ лобулярного типу ($p < 0,05$); негативний зв'язок зі ступенем диференціювання G1 (відносно рівня як СФЕР, так і ПФЕР) і G2 (відносно рівня ПФЕР). Достовірних кореляційних зв'язків між показниками СФЕР і ФЕР у ПК однієї й тієї самої хворої в нашому дослідженні не виявлено ($r = 0,12$; $p > 0,05$).

Враховуючи варіабельність клінічного перебігу РМЗ, був доцільним аналіз рівня СФЕР і експресії ФЕР у ПК РМЗ різних молекулярних підтипів. Як видно з табл. 4, середній вік хворих на РМЗ люмінального А підтипу становив $59,6 \pm 8,7$ року, люмінального Б підтипу — $56,6 \pm 5,4$ року ($p > 0,05$). Середній вік пацієнток із РМЗ базального підтипу був достовірно більшим ($p < 0,05$) і становив $67,2 \pm 13,5$ року. За розповсюдженням процесу при всіх трьох молекулярних підтипах РМЗ переважала II стадія. Найчастіше діагностовано дуктальний рак помірного ступеня диференціювання (за винятком пухлин люмінального Б підтипу, серед яких

Таблиця 2

Рівні СФЕР та кількість ФЕР+ пухлин (ПФЕР) залежно від клініко-патологічних особливостей РМЗ

Показник	Кількість хворих		Кількість хворих із рівнем СФЕР (нг/мл), вищим за референтні значення, n (%)	Кількість хворих з ФЕР+ РМЗ, n (%)		ПФЕР, середня кількість балів, H-Score
	n	%		Низька експресія, H-Score 50–100 балів	Помірна і висока експресія, H-Score 101–300 балів	
Стадія I	47	100	32 (68,1)	30 (63,8)	17 (36,2)	$168,0 \pm 15,7$
Стадія II	104	100	69 (66,4)	60 (57,7)	44 (42,3)	$161,7 \pm 12,5$
Гістологічний тип						
Інфільтративний дуктальний рак	101	100	66 (65,4)	72 (71,3)	29 (28,7)	$189,0 \pm 16,2$
Інфільтративний лобулярний рак	50	100	35 (70,0)	18 (36,0)	32 (64,0)	$183,0 \pm 14,9$
Ступінь диференціювання раку						
G1 (високий)	42	100	19 (45,2)	23 (54,8)	19 (45,2)	$176,0 \pm 12,3$
G2 (помірний)	78	100	58 (74,3)	48 (61,5)	30 (38,5)	$184,0 \pm 14,5$
G3 (низький)	31	100	26 (83,9)	19 (71,3)	12 (38,7)	$172,0 \pm 15,3$
			* $p < 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Примітка: * $p < 0,05$ при порівнянні хворих на РМЗ G3 та хворих на РМЗ G1 і G2.

Кореляція рівня СФЕР і експресії ФЕР у ПК (ФЕР) з клініко-патологічними характеристиками РМЗ

Пари кореляцій		Коефіцієнт кореляції Пірсона, r	p	Оцінка кореляційного зв'язку
Рівень СФЕР	Хворі віком < 50 років	0,41	p > 0,05	Позитивна кореляція
	Хворі віком > 50 років	0,47	p > 0,05	
Експресія ПФЕР	Хворі віком < 50 років	0,35	p > 0,05	
	Хворі віком > 50 років	0,51	p > 0,05	
Рівень СФЕР	Стадія I	0,02	p < 0,05	Відсутність кореляції
Експресія ПФЕР	Стадія I	0,031	p < 0,05	
Рівень СФЕР	Стадія II	0,001	p > 0,05	Відсутність кореляції
Експресія ПФЕР	Стадія II	0,0017	p > 0,05	
Рівень СФЕР	Дуктальний рак	0,16	p > 0,05	Відсутність кореляції
	Лобулярний рак	0,34	p < 0,05	
Експресія ПФЕР	Дуктальний рак	0,01	p < 0,05	Відсутність кореляції
	Лобулярний рак	0,36	p < 0,05	
Рівень СФЕР	Ступінь диференціювання G1	-0,25	p < 0,05	Від'ємний зв'язок
	Ступінь диференціювання G2	0,03	p < 0,05	Відсутність кореляції
	Ступінь диференціювання G3	0,13	p > 0,05	Відсутність кореляції
Експресія ПФЕР	Ступінь диференціювання G1	-0,27	p < 0,05	Від'ємний зв'язок
	Ступінь диференціювання G2	-0,17	p > 0,05	Від'ємний зв'язок
	Ступінь диференціювання G3	0,013	p < 0,05	Відсутність кореляції

Таблиця 4

Характеристика хворих на РМЗ різних молекулярних підтипів

Характеристика	Молекулярний підтип					
	Люмінальний А n = 81 (100%)		Люмінальний Б n = 35 (100%)		Базальний n = 35 (100%)	
	n	%	n	%	n	%
Середній вік, років	59,6 ± 8,7		56,6 ± 5,4		67,2 ± 13,5	
Репродуктивний період, n = 29	15	18,5	10	28,6	4	11,4
Менопаузальний період, n = 122	66	81,5	25	71,4	31	88,6
Стадія						
I, n = 47	27	33,3	11	31,4	9	25,7
II, n = 104	54	66,6	24	68,6	26	74,3
Метастази в регіонарних лімфатичних вузлах						
N0, n = 109	55	67,9	24	68,6	30	85,7
N1, n = 42	26	32,1	11	31,4	5	14,3
Гістологічний тип						
Інфільтративний дуктальний рак, n = 101	51	62,9	25	71,4	25	71,4
Інфільтративний лобулярний рак, n = 50	30	37,1	10	28,6	10	28,6
Ступінь диференціювання						
G1 (високий), n = 42	7	8,6	19	54,3	16	45,7
G2 (помірний), n = 78	53	65,4	9	25,7	16	45,7
G3 (низький), n = 31	21	25,9	7	20,0	3	8,6

дещо переважали високодиференційовані пухлини). Таким чином, групи хворих на РМЗ із різними молекулярними підтипами суттєво не відрізнялися за клініко-морфологічними характеристиками.

Як видно з даних табл. 5, середні рівні СФЕР у групах хворих із люмінальним А і Б молекулярними підтипами були практично однаковими (p > 0,1) і мали лише тенденцію до підвищення порівняно з референтними значеннями. На протипагу цьому, у групі пацієток із базальним підтипом РМЗ середній рівень СФЕР достовірно перевищував показники норми та становив 234,9 ± 24,3 нг/мл (p < 0,05) при коливаннях від 203,5 до 387,2 нг/мл. Слід відзначити, що такий середній рівень СФЕР перевищував показники у хворих на РМЗ люмінальних підтипів у 1,5 раза. Крім того, у 15 (42,8%) із 35 пацієток із РМЗ базального підтипу рівень СФЕР перевищував референтні значення майже вдвічі (p < 0,01). Подібні зміни у бік підвищення відзначено і при аналізі експресії ФЕР у пухлинах базального молекулярного підтипу (частота ФЕР+ пухлин — 85,7% проти

28,4% при люмінальному А і 45,7% — при люмінальному Б підтипах РМЗ (p < 0,05)). Показники H-score у базальному підтипі РМЗ були також достовірно вищими, що вказує на значний рівень експресії ФЕР у ПК. У результаті статистичної обробки встановлено прямий помірний кореляційний зв'язок між рівнем СФЕР та експресією ФЕР у ПК РМЗ базального підтипу (r = 0,46; p < 0,05).

Статистичний аналіз дозволив встановити неонадкову залежність показників ФЕР від клініко-морфологічних характеристик РМЗ різного молекулярного підтипу (табл. 6). Зокрема, у пацієток як з люмінальними, так і базальними підтипами РМЗ не виявлено достовірних відмінностей у рівнях СФЕР та експресії ФЕР у ПК залежно від віку та стадії захворювання. У хворих на РМЗ люмінального А/Б підтипу встановлено лише тенденцію до підвищення рівня СФЕР та експресії ФЕР у ПК при інфільтративному лобулярному раку порівняно з пухлинами дуктальної будови; у пацієток з базальним РМЗ така різниця була достовірною (рис. 2). У хворих на РМЗ ба-

Порівняльний аналіз рівня СФЕР і кількості ФЕР+ пухлин залежно від молекулярного підтипу РМЗ

Молекулярний підтип РМЗ	Кількість хворих (n = 151), %	Рівень СФЕР, нг/мл		Кількість ФЕР+ пухлин	
		Коливання індивідуальних показників	Середні показники	Помірна і висока експресія, n (%)	Середня кількість балів, H-Score
Люмінальний А n = 81 (100%)	53,6	121,4–217,6	157,6 ± 22,1	23 (28,4)	168,0 ± 15,3
Люмінальний Б n = 35 (100%)	23,2	125,3–204,2	157,6 ± 19,1	16 (45,7)	173,0 ± 14,6
Базальний n = 35 (100%)	23,2	203,5–387,2	234,9 ± 24,3*	30 (85,7)*	216,0 ± 18,2*

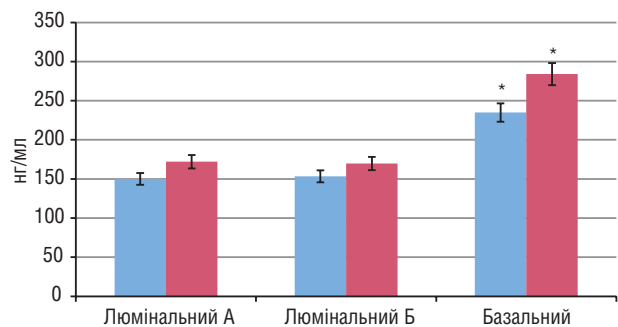
Примітка: *різниця достовірна між люмінальними А/Б і базальним підтипом РМЗ.

зального підтипу відзначено кореляційний зв'язок показників ФЕР із гістологічним типом пухлини (для СФЕР $r = 0,28$, для ФЕР у ПК $r = 0,27$). При РМЗ люмінальних підтипів кореляція досліджених показників ФЕР зі ступенем диференціювання пухлини була відсутня (рис. 3), у хворих на РМЗ базального підтипу така кореляція була виявлена (для інфільтративного дуктального раку $r = -0,30$, для інфільтративного лобулярного раку $r = 0,37$).

Таким чином, нами встановлено певну залежність рівня СФЕР та експресії ФЕР у ПК від клініко-морфологічних та молекулярних прогностичних чинників (особливо при РМЗ базального підтипу), що свідчить про порушення гомеостазу заліза в організмі хворих та вірогідну роль ФЕР у формуванні молекулярного фенотипу ПК. Одержані дані під-

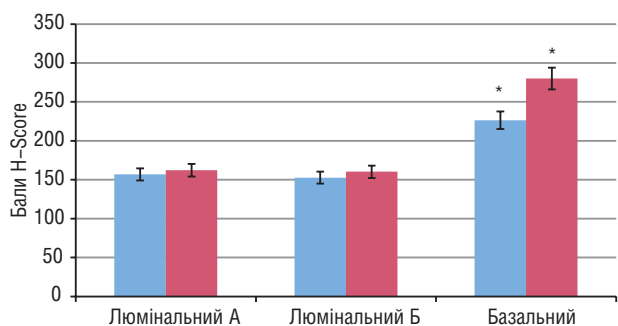
тверджують результати інших досліджень [15, 18, 19, 27] про порушення залізовмісних білків при пухлинному рості. Це дає нам право підтримати думку, що рак можна віднести до феротоксичних захворювань [25, 26]. Встановлено зв'язок показників ФЕР із віковим періодом хворих, що збігається з даними літератури та є свідченням того, що гормональний статус жінки тісно асоційований зі значними коливаннями вмісту заліза в організмі [14]. Вагомим підтвердженням цього є відомості, що порушення метаболізму естрогенів у жінок на фоні надлишку заліза призводить до стимуляції синтезу ФЕР у ПК молочної залози [15, 26].

Відсутність залежності рівня СФЕР та експресії ФЕР у ПК від стадії захворювання, можливо, пов'язана з наявністю додаткових факторів регу-



■ Інфільтративний дуктальний рак ■ Інфільтративний лобулярний рак

а

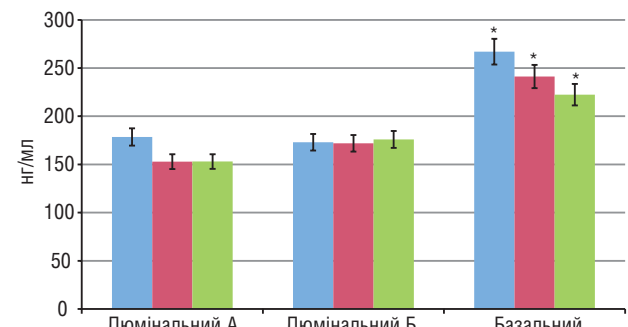


■ Інфільтративний дуктальний рак ■ Інфільтративний лобулярний рак

б

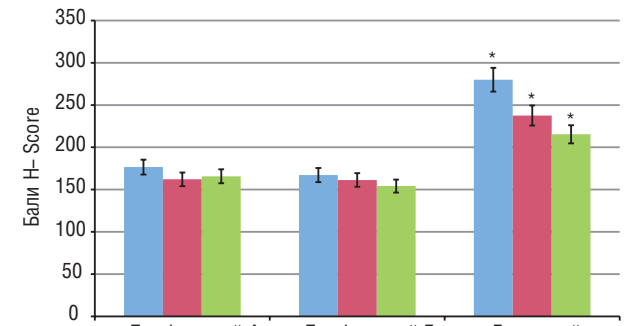
Рис. 2. Розподіл рівня СФЕР (а) і експресії ФЕР у ПК (б) залежно від гістологічної структури і молекулярного підтипу РМЗ.

Примітка: * $p < 0,05$ при порівнянні люмінальних і базального молекулярних підтипів РМЗ



■ Низький ■ Середній ■ Високий

а



■ Низький ■ Середній ■ Високий

б

Рис. 3. Розподіл рівня СФЕР (а) і експресії ФЕР у ПК (б) залежно від ступеня диференціювання пухлин у хворих різного молекулярного підтипу.

Примітка: * $p < 0,05$ при порівнянні показників хворих з базальним і люмінальними молекулярними підтипами РМЗ

Рівень СФЕР та експресія ФЕР у ПК (ПФЕР)
залежно від клініко-патологічних характеристик РМЗ різних молекулярних підтипів

Молекулярний підтип РМЗ	Стадія захворювання				Гістологічний тип пухлини				Ступінь диференціювання пухлини					
	I		II		Дуктальний рак		Лобулярний рак		Низький		Помірний		Високий	
	СФЕР, нг/мл	ПФЕР, H-Score	СФЕР, нг/мл	ПФЕР, H-Score	СФЕР, нг/мл	ПФЕР, H-Score	СФЕР, нг/мл	ПФЕР, H-Score	СФЕР, нг/мл	ПФЕР, H-Score	СФЕР, нг/мл	ПФЕР, H-Score	СФЕР, нг/мл	ПФЕР, H-Score
Люмінальний А	150,2 ± 19,3	168,7 ± 12,4	156,1 ± 19,7	161,2 ± 7,6	150,0 ± 19,6	156,8 ± 10,2	172,1 ± 18,4	162,1 ± 9,7	178,5 ± 9,7	176,6 ± 13,1	152,9 ± 19,3	162,4 ± 10,9	153,0 ± 17,2	165,7 ± 11,2
Люмінальний Б	176,1 ± 36,2	161,8 ± 14,1	171,4 ± 22,9	159,7 ± 12,8	153,3 ± 18,0	152,6 ± 8,1	169,7 ± 20,5	160,2 ± 11,6	173,0 ± 18,2	167,2 ± 11,4	171,9 ± 22,6	161,3 ± 16,3	175,9 ± 16,3	154,2 ± 8,2
Базальний	229,0 ± 22,9	222,5 ± 13,7	239,1 ± 26,2	226,7 ± 15,9	234,9 ± 13,2	226,3 ± 11,3	284 ± 16,3	280 ± 12,6	267 ± 10,7	280 ± 16,2	241,1 ± 27,9	237,6 ± 12,5	222,37 ± 6,2	215,4 ± 13,7

ляції цього білка та обміну заліза в організмі при прогресуванні пухлинного процесу [28]. Отримані дані щодо високого рівня СФЕР і значної експресії ФЕР у ПК РМЗ низького ступеня диференціювання є підтвердженням участі цього залізовмісного білка у проліферації, рості та формуванні ступеня злоякісності РМЗ, адже гірший клінічний перебіг пов'язаний із низьким ступенем диференціювання пухлин. Про це також свідчать результати наших попередніх досліджень у системі *in vitro* щодо високого рівня ФЕР у клітинах ліній РМЗ людини, які характеризуються агресивним мезенхімальним фенотипом, та у хворих із низькодиференційованими пухлинами [29–31].

Встановлена кореляційна залежність рівня СФЕР і кількості ФЕР+ пухлин від молекулярного підтипу РМЗ може свідчити про роль ФЕР не тільки у патогенезі РМЗ, а й у формуванні молекулярного профілю пухлин цього гістогенезу. Отримані нами дані щодо підвищеного рівня СФЕР і збільшення кількості ФЕР+ пухлин у хворих на РМЗ базального підтипу і низького ступеня диференціювання вказують, що такі показники можуть бути використані для предикативної оцінки агресивності РМЗ. Таким чином, зазначені факти ще раз підтверджують результати попередніх власних досліджень про значення експресії ФЕР для таких показників РМЗ, як проліферація, рецепторний статус, туморогенність і про можливість використання експресії ФЕР у ПК як маркера індивідуального прогнозу виживаності хворих на РМЗ. Одержані результати повторно доводять правильність тези, що залізовмісні білки задіяні у складних біологічних процесах РМЗ і можуть бути молекулярними мішенями для протипухлинних препаратів, що потребує подальших експериментальних та клінічних досліджень.

ВИСНОВКИ

1. У хворих на РМЗ відзначено індивідуальні коливання концентрації СФЕР та експресії ФЕР у ПК, залежність цих показників від гістологічної будови і ступеня диференціювання пухлини за відсутності залежності від стадії пухлинного процесу.

2. Найбільші зміни показників обміну заліза спостерігаються у хворих на базальний РМЗ, для якого притаманний агресивний клінічний перебіг та низька чутливість до протипухлинної цитостатичної терапії, тобто виявлені зміни залізовмісних білків у сироватці крові та у пухлинах свідчать про асоціацію показників метаболізму заліза зі ступенем злоякісності РМЗ.

3. Одержані результати свідчать про перспективність подальших досліджень ФЕР і застосування його показників в онкологічній клінічній практиці як додаткових критеріїв для оцінки агресивності РМЗ різних молекулярних підтипів і прогнозу клінічного перебігу захворювання.

4. Отримані дані можуть стати підґрунтям для розробки нових діагностичних критеріїв та удосконалення існуючих схем протипухлинного лікування з урахуванням порушень обміну заліза у хворих на РМЗ.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Кулигина ЕШ. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы. *Практ онкол* 2010; **11** (4): 203–16.
- Kristensen VN, Vaske CJ, Ursini-Siegel J, et al. Integrated molecular profiles of invasive breast tumors and ductal carcinoma *in situ* (DCIS) reveal differential vascular and interleukin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; **109** (8): 2802–7.
- Sørlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer* 2004; **40** (18): 2667–75.
- Naume B, Zhao X, Synnestvedt M, et al. Presence of bone marrow micrometastasis is associated with different recurrence risk within molecular subtypes of breast cancer. *Mol Oncol* 2007; **1** (2): 160–71.

5. Myhre S, Lingjærde OC, Hennessy BT, *et al.* Influence of DNA copy number and mRNA levels on the expression of breast cancer related proteins. *Mol Oncol* 2013; 7 (3): 704–18.

6. Lips EH, Mulder L, de Ronde JJ, *et al.* Breast cancer subtyping by immunohistochemistry and histological grade outperforms breast cancer intrinsic subtypes in predicting neoadjuvant chemotherapy response. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 140: 63–71.

7. Boyle DP, McCourt CM, Matchett KB, *et al.* Molecular and clinicopathological markers of prognosis in breast cancer. *Expert Rev Mol Diagnostics* 2013; 13: 481–98.

8. Langlands FE, Horgan K, Dodwell DD, Smith L. Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *Br J Radiol* 2013; 86 (1023): 20120601.

9. Si C, Jin Y, Wang H, Zou Q. Association between molecular subtypes and lymph node status in invasive breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 157 (10): 6800–6.

10. Laakso M, Tanner M, Nilsson J, *et al.* Basolateral carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4185–91.

11. Eckard J, Dai J, Wu J, *et al.* Effects of cellular iron deficiency on the formation of vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Cancer Cell Int* 2010; 10: 28–33.

12. Whitnall M, Howard J, Ponka P, Richardson DR. A class of iron chelators with a wide spectrum of potent antitumor activity that overcome resistance to chemotherapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103 (40): 14901–6.

13. Strasser-Weippl K, Ludwig H. Ferritin as prognostic marker in multiple myeloma patients undergoing autologous transplantation. *Leuk Lymphoma* 2014; 55 (11): 2520–4.

14. Marques O, da Silva BM, Porto G, Lopes C. Iron homeostasis in breast cancer. *Cancer Lett* 2014; 347 (1): 1–14.

15. Moore AB, Shannon J, Chen C, *et al.* Dietary and stored iron as predictors of breast cancer risk: a nested case-control study in Shanghai. *Int J Cancer* 2009; 125: 1110–7.

16. Cozzi A, Corsi B, Levi S, *et al.* Overexpression of wild type and mutated human ferritin H-chain in HeLa cells: *in vivo* role of ferritin ferroxidase activity. *J Biol Chem* 2000; 275: 25122–9.

17. Torti SV, Torti FM. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 342–55.

18. Knovich MA, Storey JA, Lan G, *et al.* Ferritin for the clinician. *Blood Rev* 2009; 23 (3): 95–104.

19. Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790 (7): 589–99.

20. Saletta F, Rahmanto YS, Siafakas AR, Richardson DR. Cellular iron depletion and the mechanisms involved in the iron-dependent regulation of the growth arrest and DNA damage family of genes. *J Biol Chem* 2011; 286: 35396–406.

21. Alkhateeb AA, Connor JR. Nuclear ferritin: A new role for ferritin in cell biology. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800 (8): 793–7.

22. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, *et al.* Serum ferritin: past, present and future. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1800: 760–9.

23. Антіпова СВ, Шепіль ОВ, Лук'янова НЮ, Чехун ВФ. Зв'язок рівня феритину в сироватці крові та пухлинній тканині з чутливістю до неoad'ювантної хіміотерапії у хворих на рак молочної залози. *Онкологія* 2013; 15 (3): 204–9.

24. Чехун ВФ, Шепіль ОВ, Лук'янова НЮ та ін. Спосіб прогнозування чутливості до неoad'ювантної терапії у хворих на рак молочної залози. Патент № 84044 від 10.10.2013. Опубл Бюл № 19/2013.

25. Chekhun VF, Lukyanova NY, Burlaka AP, *et al.* Iron metabolism disturbances in the MCF-7 human breast cancer cells with acquired resistance to doxorubicin and cisplatin. *Int J Oncol* 2013; 43 (5): 1481–6.

26. Alkhateeb AA, Connor JR. The significance of ferritin in cancer: anti-oxidation, inflammation and tumorigenesis. *Biochem Biophys Acta* 2013; 1836 (2): 245–54.

27. Toyokuni S. Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease. *Cancer Sci* 2009; 100: 9–16.

28. Kukulj S, Jaganjac M, Boranic M, *et al.* Altered iron metabolism, inflammation, transferring receptors, and ferritin expression in non-small-cell lung cancer. *Med Oncol* 2010; 27 (2): 268–77.

29. Шепіль ОВ, Лук'янова НЮ, Чехун СВ та ін. Дослідження експресії трансферину і феритину у пухлинних клітинах хворих на рак молочної залози. *Онкологія* 2014; 16 (2): 108–112.

30. Shpyleva SI, Tryndyak VP, Kovalchuk O, *et al.* Role of ferritin alterations in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 126 (1): 63–71.

31. Chekhun SV, Lukyanova NYu, Shvets YuV, *et al.* Significance of ferritin expression in formation of malignant phenotype of human breast cancer cells. *Exp Oncol* 2014; 36 (3): 179–183.

THE RELATIONSHIP OF SERUM AND TUMOR FERRITIN LEVELS WITH CLINICO-MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND MOLECULAR SUBTYPE OF TUMORS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

S.V. Chekhun, N.Y. Lukyanova, S.O. Sobchenko,
T.V. Zadovny, Y.V. Lozovska,
L.G. Buchinska, L.Z. Polishchuk

Summary. Objective: to investigate the concentration of ferritin (FER) in blood serum (SFER) of patients with breast cancer (BC), its relation to the expression of FER in tumor cells (TC) depending on the clinical and pathological features, including the different molecular subtypes of BC. **Subject and methods:** it was studied 151 patients with BC stages I–II, aged 28 to 89 years (mean age $60,5 \pm 11,6$ years) using clinical, ELISA, morphological, statistical methods. **Results:** it was determined significant increase in SFER and FER in TC of patients with basal subtype of BC compared to luminal A and B subtypes of tumors. The existence of a direct correlation between the level of SFER and FER expression in TC of patients with BC cancer basal subtype was revealed. The dependence of FER indicis from the age of patients, histological structure and degree of tumor differentiation without depending on the stage of the disease was analyzed. **Conclusion:** the investigated molecular subtypes of BC are characterized by considerable heterogeneity of level of serum and tumor FER; FER indicis can be used as additional markers degree of malignancy and prognosis of clinical criteria of the disease and BC sensitivity to drug therapy.

Key Words: breast cancer, molecular subtype, ferritin.

Адреса для листування:

Чехун С.В.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

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

E-mail: chekhun@yahoo.com

Одержано: 05.12.2014