

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-κB,  
Ki-67, p53, Vcl-2, E-cadherin,  
ODC, молекулярний профіль.

## ОСОБЛИВОСТІ ЕКСПРЕСІЇ NF-κB ТА ODC У ПУХЛИНАХ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ З РІЗНИМ МОЛЕКУЛЯРНИМ ПРОФІЛЕМ

**Мета:** проаналізувати рівень експресії субодиниць фактора транскрипції NF-κB (p50 та p65), білків Ki-67, p53, Vcl-2, E-cadherin та ODC у пухлинній тканині хворих на рак молочної залози (PM3) залежно від типу пухлини за молекулярною та ноттінгемською класифікаціями. **Методи:** у дослідженні використано зразки фіксованої в формаліні, залитої в парафін пухлинної тканини 132 хворих з інфільтруючим протоковим PM3. Експресію молекулярних маркерів визначали імуногістохімічним методом, використовуючи МкАТ. Взаємозв'язок досліджуваних параметрів оцінювали за допомогою кореляційного аналізу. **Результати:** виявлено обернений кореляційний зв'язок між значенням ноттінгемського прогностичного індексу (НПІ) та рівнем експресії рецепторів стероїдних гормонів (ER і PR) і Vcl-2, а також прямих — з рівнем проліферації пухлини (Ki-67). Відзначено пряму кореляцію між рівнем експресії ODC та рівнями p53 і E-cadherin. При вивченні залежності клініко-морфологічних та молекулярних особливостей пухлини від профілю експресії NF-κB встановлено, що найвищий рівень субодиниць NF-κB (p50 та p65) був асоційований із негативним статусом ER та PR, гіперекспресією Her2/neu, низьким рівнем Vcl-2 та високим значенням НПІ. Аналіз особливостей пухлин із різним молекулярним підтипом показав, що Her2/neu-позитивний та базальний підтипи характеризуються достовірно вищим значенням НПІ, рівнем проліферації, експресії p53 та p65-субодиниць NF-κB і нижчим рівнем Vcl-2 порівняно з люмінальним та гібридним підтипами. **Висновок:** отримані дані можуть опосередковано свідчити про поганий прогноз і хіміорезистентність пухлин молочної залози з активованим NF-κB, однак це потребує подальших досліджень і ретроспективного аналізу великої вибірки пацієнтів.

### ВСТУП

В Україні рак молочної залози (PM3) займає перше місце в структурі онкологічної захворюваності та смертності серед жінок. Суттєвий вплив на прогноз перебігу захворювання має своєчасна діагностика. Однак, незважаючи на постійне вдосконалення методів діагностики та лікування, загальна 5-річна виживаність продовжує займати перше місце в структурі смертності від злоякісних новоутворень у 2011 р. — 20,2% від загального показника, згідно з даними Національного канцер-реєстру України становить 56,2% [1, 2].

Саме тому постійно проводяться дослідження різноманітних чинників, що впливають на перебіг захворювання та чутливість пухлини до терапії. Першими прогностичними факторами були клінічні характеристики пацієнток (вік, менструальний статус, розмір пухлини тощо). Згодом до них долучили морфологічні властивості пухлин (ступінь диференціювання, гістологіч-

на форма, ноттінгемський прогностичний індекс — НПІ).

За кілька останніх десятиріч розуміння біології пухлини було значно поглиблене за рахунок молекулярно-біологічних досліджень, до клініко-морфологічних факторів прогнозу перебігу захворювання додаються все нові молекулярні особливості пухлинних клітин. Нині для пацієнтів із PM3 стандартом є визначення трьох маркерів: рецепторів до естрогенів (ER), прогестерону (PR) та Her2/neu. Саме ці три маркери стали основою для сучасної молекулярної класифікації PM3, згідно з якою виділяють люмінальний, базальний, Her2/neu-позитивний та гібридний підтипи, що відрізняються за профілем експресії цих маркерів і визначають різний прогноз перебігу хвороби [3–5].

Застосування вищезазначених маркерів і молекулярної класифікації в клінічній практиці сприяло індивідуалізації лікування хворих на PM3 та призначенню адекватних хіміотерапевтичних схем. Однак

наразі в клінічну практику введено багато інших молекулярних маркерів, визначення яких вносить додаткову інформацію щодо біологічних властивостей пухлини. Більшість із них залучені до патологічних процесів, що в сукупності визначають здатність клітини до злоякісного росту [6]. До таких маркерів належать білки-регулятори апоптозу (p53 та Bcl-2), білки міжклітинної адгезії (E-cadherin), маркери проліферації (Ki-67) тощо.

Перспективними маркерами, що є потенційними мішенями для терапії, можуть бути фактори транскрипції, адже, впливаючи на транскрипцію онкогенів та факторів апоптозу, вони відіграють важливу роль у формуванні хіміорезистентності. Одним із транскрипційних факторів, порушення функціонування якого часто має місце в злоякісних пухлинах, є NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B).

Найповніше з родини білків транскрипційного фактора NF- $\kappa$ B досліджено білки p50 та p65, що формують класичний гетеродимер NF- $\kappa$ B. У більшості клітин NF- $\kappa$ B знаходиться в цитоплазмі в неактивному стані за рахунок зв'язування з ним інгібіторних білків класу I- $\kappa$ B. У ході активації NF- $\kappa$ B під дією різноманітних індукторів відбувається фосфорилування I- $\kappa$ B, після чого він убіквітинізується і гідролізується протеїназним комплексом, а вільний NF- $\kappa$ B транслокується в ядро, в якому впливає на транскрипцію багатьох генів. Численні сучасні дані вказують на важливу роль NF- $\kappa$ B у підтриманні життєдіяльності пухлини. На сьогодні виявлено два важливі механізми впливу NF- $\kappa$ B на пухлинні процеси. Перший полягає в тому, що експресія багатьох онкогенів (наприклад *c-myc*), генів-супресорів (p53), білків онкогенних вірусів (SV-40, ретровіруси, аденовіруси) контролюється фактором NF- $\kappa$ B або активація NF- $\kappa$ B залежить від експресії певних онкобілків, наприклад gas. Другим важливим моментом є вплив NF- $\kappa$ B на чутливість пухлини до хіміотерапії та імунні реакції організму [7]. Так, продемонстровано, що лише 20% хворих на РМЗ із активованим NF- $\kappa$ B відповідали на хіміотерапію; окрім цього, в частині випадків рівень NF- $\kappa$ B в ядрах пухлинних клітин підвищувався після терапії, що, на думку С. Montagut та співавторів (2006), може бути причиною формування хіміорезистентності [8].

Вивчається також взаємозв'язок експресії NF- $\kappa$ B з експресією інших маркерів. Більшість результатів свідчать, що NF- $\kappa$ B активується насамперед в ER-негативних та HER2-позитивних пухлинах [8–10]. Такі пухлини молочної залози зазвичай мають високий Grade і проліферативний індекс та формують групу з найгіршим прогнозом і високою хіміорезистентністю.

Окрім змін у молекулярно-біологічних сигнальних каскадах, важливу роль у злоякісній трансформації та підтриманні пухлинного росту відіграє біохімічна трансформація клітини та навколишнього середовища. Суттєвих змін при он-

когенезі зазнає метаболізм поліамінів (ПА). ПА — це біологічно активні низькомолекулярні сполуки, що є ендogenous регуляторами клітинного метаболізму. Для багатьох злоякісних пухлин показано значне підвищення конститутивного рівня ПА, що знаходить відображення в модифікації метаболізму клітини [11–14]. Однак молекулярні механізми функціонування ПА в пухлинних клітинах вивчено недостатньо. Перспективним напрямом дослідження ПА є розробка та тестування інгібіторів ферментів їхнього синтезу й аналогів самих ПА [15]. Так, показана висока ефективність інгібітора орнітиндекарбоксілази (ODC)  $\alpha$ -ДФМО при злоякісних пухлинах кишечника. Таким чином, вивчення метаболізму ПА та експресії його ферментів сприяє розумінню молекулярних механізмів у злоякісній клітині та функціонування пухлини в цілому.

Отже, незважаючи на те що основою для вибору тактики лікування РМЗ залишається визначення статусу рецепторів стероїдних гормонів та Her2/неу, доцільним є розширення спектра досліджуваних маркерів, оскільки вони дають додаткову інформацію про пухлину та сприяють індивідуалізації терапевтичних схем.

Метою роботи було вивчити, як залежно від типу пухлини за нотінгемською та молекулярно-біологічною класифікацією змінюється рівень експресії NF- $\kappa$ B, Ki-67, p53, Bcl-2, E-кадгерину та ODC.

## ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженні використано зразки пухлин 132 пацієнток із РМЗ у віці від 28 до 81 року (середній вік — 60 років), що проходили діагностику та лікування на базі Івано-Франківського ООД та дали інформовану згоду на включення у дослідження і використання операційного матеріалу з дослідницькою метою. Усі проаналізовані пухлини за морфологічною будовою належали до інвазивних протокових карцином із різним ступенем диференціювання (G). Клінічні дані пацієнток і характеристики пухлин наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Клінічні дані пацієнток і морфологічна характеристика пухлин		
Характеристика	n	%
Загальна кількість пацієнток	132	100
Стадія РМЗ		
I	17	13
II	87	66
III	28	21
Наявність метастазів у лімфатичних вузлах		
+	82	62
-	50	38
Ступінь диференціювання (Grade)		
1	17	13
2	84	64
3	31	23
НПІ		
1	18	14
2	83	63
3	31	23

НПІ обчислювали за такою формулою:

$NPI = \text{статус лімфовузлів (від 1 до 3)} + G \text{ (від 1 до 3)} + \text{розмір пухлини (діаметр} \cdot 0,2)$ .

Статус лімфовузлів: 1 бал — відсутність у них метастазів; 2 бали — 1–3 уражені лімфовузли; 3 бали — більше 3 уражених лімфовузлів. Після визначення НПІ пацієнтів розділяють на прогностичні групи (кожен дослідник виділяє різну кількість груп). У класичних працях М.Н. Galea та співавторів виділено 3 групи: 1) хороший прогноз (НПІ = 2,08–3,40) — 29% пацієнтів (15-річна виживаність 80%); 2) помірний прогноз (НПІ = 3,42–5,40) — 54% (15-річною виживаністю — 42%); 3) поганий прогноз (НПІ = 5,42–6,80) — 17% (15-річна виживаність 13%) [16–19].

Рівень експресії маркерів визначали імуногістохімічним методом за загальноприйнятою методикою. Для дослідження використовували такі антитіла: Estrogen Receptor  $\alpha$  (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- $\kappa$ B p50 (NLS) (Polyclonal Rabbit Anti-Human, 1:200, sc114, SantaCruz Biotechnology), p-NF- $\kappa$ B p65 (Ser 536) (Polyclonal Rabbit Anti-Human, 1:200 sc-33020, SantaCruz Biotechnology), Ki-67 (Monoclonal Mouse Anti-Human, RTU, clone MIB-1, Dako), p53 (Polyclonal Rabbit Anti-Human, 1:100, RP 106, Diagnostic BioSystems), Bcl-2 (Monoclonal Mouse Anti-Human, RTU, clone 124, Dako), E-cadherin (Monoclonal Mouse Anti-Human, RTU, clone NCH-38, Dako), Anti-ornithinedecarboxylase (ODC) (Monoclonal Mouse, clone ODC-29, 1:200, Sigma-aldrich). Реакцію виявляли за допомогою системи детекції EnVision™ FLEX+, High pH (Dako).

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

$H = 3 \cdot \% \text{ інтенсивно забарвлених} + 2 \cdot \% \text{ помірно забарвлених} + 1 \cdot \% \text{ слабо забарвлених клітин}$ .

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

Для інтерпретації результатів визначення рівня експресії Her2/neu застосовували такі критерії: 0 — відсутність забарвлення; 1+ — слабе неповне забарвлення мембран пухлинних клітин; 2+ — середня інтенсивність забарвлення мембран  $> 10\%$  клітин; 3+ — інтенсивне забарвлення мембрани  $> 10\%$  клітин. Пухлини з рівнем експресії 0 та 1+ вважали Her2/neu-негативними, з 2+ та 3+ — позитивними.

Рівень проліферації оцінювали за допомогою реакції з МкАТ проти Ki-67: 0 — відсутність ядерного забарвлення; 1 — 1–10% забарвлених ядер; 2 — 11–20%; 3 — 21–50%; 4 —  $> 50\%$ . У пухлинах із рівнем експресії Ki-67 0 та 1 рівень проліферації вважали низьким; із рівнем 2; 3 та 4 — високим.

p53-статус пухлини визначали за рівнем його накопичення в ядрах пухлинних клітин. Негативний статус (0) — ядерне забарвлення  $< 10\%$ . Позитивний статус: 1 — 11–20%; 2 — 21–50%; 3 — 51–75%; 4 —  $> 75\%$  ядер.

Рівень експресії Bcl-2, ODC та E-cadherin вважали низьким (1) за наявності слабкого цитоплазматичного (для Bcl-2 та ODC) та мембранного (для E-cadherin) забарвлення  $> 10\%$  пухлинних клітин; помірним (2) — при забарвленні середньої інтенсивності  $> 10\%$ ; високим (3) — при інтенсивному забарвленні  $> 10\%$ .

Статистичний аналіз проводили за допомогою програми SPSS. Для виявлення кореляції визначали коефіцієнт кореляції Пірсона, а для перевірки її достовірності застосовували критерій  $\chi^2$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У пухлинах хворих на РМЗ досліджено рівні експресії таких молекулярно-біологічних маркерів: ER, PR, Her2/neu, субодиниць фактора транскрипції NF- $\kappa$ B (p50 і p65), Ki-67, p53, Bcl-2 та E-cadherin (табл. 2). Виявлено, що у 96 (73%) пацієнток були естрогенчутливі ( $H_{ER} = 1-300$ ) пухлини, у 36 (27%) — естрогеннечутливі ( $H_{ER} = 0$ ). Пухлини 78 (59%) пацієнток експресували різні рівні PR ( $H_{PR} 1-300$ ), у 54 (41%) — експресія цього рецептора практично відсутня ( $H_{PR} < 1$ ). Гіперекспресію Her2/neu (2+, 3+) було виявлено в пухлинах 40 (30%) хворих, у той час як у 92 (70%) пухлини мали негативний Her2/neu статус (0; 1+). При дослідженні експресії субодиниць NF- $\kappa$ B високі рівні p50 та p65 виявлено відповідно у 83 (63%) та 23 (17%) пацієнток. Слід зазначити, що для всіх пухлин із високим рівнем експресії p65 характерним був і високий рівень p50. Рівень проліферації (Ki-67) в 41 (31%) випадку був низьким, а в 91 (69%) — високим. Експресія Bcl-2 була низькою у 83 (63%) і високою — у 49 (37%) пацієнток. У пухлинах 78 (59%) учасниць був виявлений високий рівень експресії E-cadherin, а в 54 (41%) — експресія була знижена або втрачена. У 36 (27%) пухлинах зареєстровано низький, а в 96 (73%) — високий рівень експресії ODC.

При статистичній обробці даних встановлено кореляційні зв'язки між клініко-морфологічними (розмір пухлини, статус аксиллярних лімфовузлів, ступінь диференціювання пухлини, клінічна стадія) та молекулярно-біологічними характеристиками пухлини. На наш погляд, найбільш повну інформацію про вплив тих чи інших маркерів на клінічний прояв захворювання дає взаємозв'язок рівня їх експресії з комплексними клініко-морфологічними показниками, наприклад значенням НПІ. Так, виявлено обернену кореляцію між значенням НПІ та рівнем експресії ER ( $r = -0,363$ ;  $p < 0,01$ ), PR ( $r = -0,422$ ;  $p < 0,01$ ) і Bcl-2 ( $r = -0,248$ ;  $p < 0,01$ ), а пряму — між НПІ та рівнем проліферації (Ki-67:  $r = 0,331$ ;  $p < 0,01$ ) (рис. 1). Крім цього, зі зростанням значень НПІ спостерігали підвищення рівнів експресії p65, p53 та ODC, однак ці взаємозв'язки не були статистично значущими.

Таблиця 2

Експресія молекулярних маркерів у пухлинах хворих на РМЗ

Статус маркера	n	%
<b>ER</b>		
-	36	27
+	96	73
<b>PR</b>		
-	54	41
+	78	59
<b>Her2/neu</b>		
-	92	70
+	40	30
<b>p65</b>		
низький (H < 100)	109	83
високий (H > 100)	23	17
<b>p50</b>		
низький (H < 100)	49	37
високий (H > 100)	83	63
<b>Ki-67</b>		
низький (< 20%)	41	31
високий (> 20%)	91	69
<b>p53</b>		
-	80	61
+	52	39
<b>Bcl-2</b>		
низький	83	63
високий	49	37
<b>E-cadherin</b>		
низький	54	41
високий	78	59
<b>ODC</b>		
низький	36	27
високий	96	73

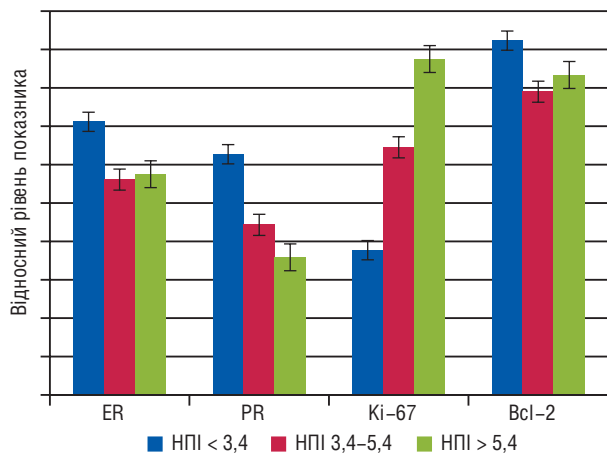
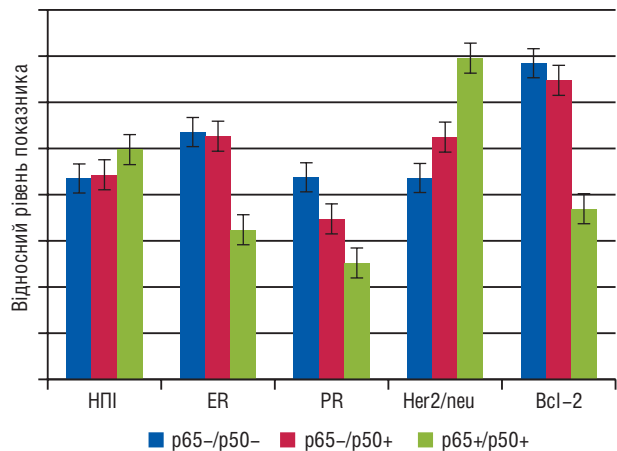


Рис. 1. Кореляція між значенням НПІ та рівнем експресії ER, PR, Ki-67 і Bcl-2

При аналізі взаємозв'язків між експресією різних досліджуваних молекулярних маркерів виявлено існування кореляції між багатьма з них. Так, наприклад, рівень експресії рецепторів стероїдних гормонів перебував у прямому кореляційному зв'язку з експресією Bcl-2 (для ER  $r = 0,541$ ,  $p < 0,01$ ; для PR  $r = 0,538$ ,  $p < 0,01$ ) та E-cadherin (для ER  $r = 0,216$ ,  $p = 0,07$ ; для PR  $r = 0,224$ ,  $p = 0,05$ ) і в оберненому — з Her2/neu (для ER  $r = -0,241$ ,  $p = 0,03$ ; для PR:  $r = -0,258$ ,  $p = 0,01$ ) та Ki-67 (для ER  $r = -0,503$ ,  $p < 0,01$ ; для PR  $r = -0,393$ ,  $p < 0,01$ ). Однак ці та деякі інші взаємозв'язки вже були встановлені й описані раніше [16, 20–22].

У проведеному дослідженні нас більше цікавили зв'язки між експресією маркерів, прогностичне та/або предиктивне значення яких вже доведено, та маркерів, для яких воно тільки вивчається (зокрема NF- $\kappa$ B та ODC). Для дослідження залежності експресії маркерів від профілю експресії NF- $\kappa$ B 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- $\kappa$ B. Виявлено пряму кореляцію профілю експресії NF- $\kappa$ B зі значенням НПІ ( $r = 0,191$ ,  $p = 0,014$ ) і статусом Her2/neu ( $r = 0,199$ ,  $p = 0,011$ ), а також обернену — з рівнем експресії ER ( $r = -0,186$ ,  $p = 0,016$ ), PR ( $r = -0,139$ ,  $p = 0,056$ ) та Bcl-2 ( $r = -0,205$ ,  $p = 0,009$ ) (рис. 2). Позитивний статус NF- $\kappa$ B асоціювався також із підвищенням рівня Ki-67 та p53 і зниженням E-cadherin, але такі взаємозв'язки не були статистично значущими.

Рис. 2. Кореляція між профілем експресії NF- $\kappa$ B та значенням НПІ; рівнем експресії ER, PR, Her2/neu, Bcl-2

При аналізі взаємозв'язків між експресією ODC та інших маркерів виявлено, що її високий рівень асоціюється з підвищенням рівня p53 ( $r = 0,271$ ,  $p = 0,002$ ) та E-cadherin ( $r = 0,201$ ,  $p = 0,016$ ) у пухлині (рис. 3). Також зі зростанням рівня ODC спостерігали підвищення показника НПІ та рівня проліферації, однак ці взаємозв'язки не були статистично значущими.

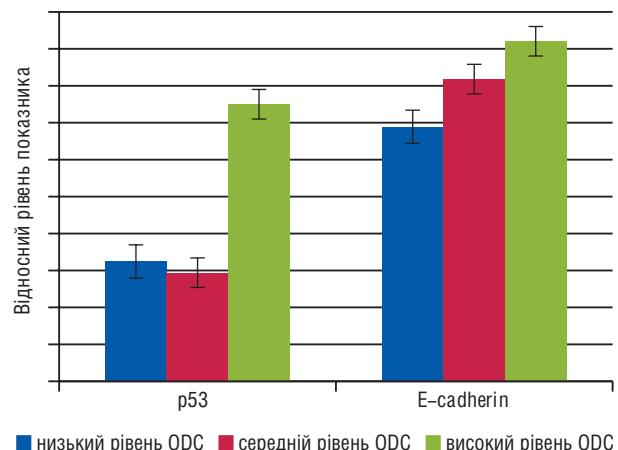


Рис. 3. Кореляція між рівнем експресії ODC та іншими маркерами



За молекулярним профілем пухлини хворих на РМЗ розподілено згідно з класифікацією D.J. Dabbs [5]. Через обмеженість вибірки ( $n = 132$ ) та незначну різницю в прогнозі перебігу захворювання для статистичного аналізу підтипи пухлин об'єднали: люмінальний А та Б — в люмінальний; тричі негативний базальний та небазальний — у базальний; гібридний люмінальний А та Б/Her2/neu — у гібридний люмінальний/Her2/neu. Отже, після об'єднання розподіл пухлин за підтипами був таким: пухлини 76 (58%) пацієнток віднесено до люмінального підтипу; 22 (16%) — до базального; 13 (10%) — до Her2-позитивного; 21 (16%) — до гібридного підтипу (табл. 3).

Таблиця 3

Розподіл хворих на РМЗ за молекулярним профілем пухлини

Молекулярний підтип	Критерії приналежності до молекулярного підтипу	Кількість пацієнток, n (%)
Люмінальний [20]	Люмінальний А [5] ER 3+; Her2/neu 0; 1+	76 (58)
	Люмінальний Б [5] ER 1+, 2+; Her2/neu 0; 1+; або ER 0; PR $\geq$ 1+; Her2/neu 0; 1+	
Базальний [5, 20]	ER 0; PR 0; Her2/neu 0; 1+	22 (16)
Her2/neu-позитивний [5, 20]	ER 0; PR 0; Her2/neu 2+, 3+	13 (10)
Гібридний [5]	Люмінальний А/ Her2/neu [5] ER 3+; Her2/neu 2+, 3+	21 (16)
	Люмінальний Б/ Her2/neu [5] ER 1+, 2+; Her2/neu 2+, 3+; або ER 0; PR $\geq$ 1+; Her2/neu 2+, 3+	

При аналізі залежності клініко-морфологічних показників і рівня експресії досліджуваних маркерів від молекулярного підтипу пухлини виявлено, що рівні експресії p65 ( $r = 0,239$ ,  $p = 0,03$ ) і Ki-67 ( $r = 0,632$ ,  $p < 0,01$ ), а також Grade ( $r = 0,501$ ,  $p < 0,01$ ) та значення НПІ ( $r = 0,399$ ,  $p < 0,01$ ) підвищуються в напрямі люмінальний  $\rightarrow$  гібридний  $\rightarrow$  Her2/neu  $\rightarrow$  базальний підтип РМЗ (рис. 4).

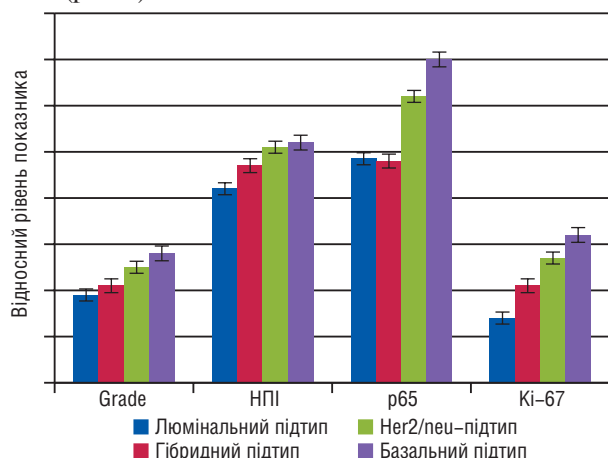


Рис. 4. Кореляція молекулярного профілю пухлини з клініко-морфологічними показниками і експресією молекулярних маркерів

Також виявлено підвищення рівня p53 ( $r = 0,310$ ,  $p < 0,01$ ) та зниження експресії Bcl-2 ( $r = -0,548$ ,  $p < 0,01$ ) у пухлинних клітинах в напрямі люмінальний  $\rightarrow$  гібридний  $\rightarrow$  базальний  $\rightarrow$  Her2/neu-підтип (рис. 5).

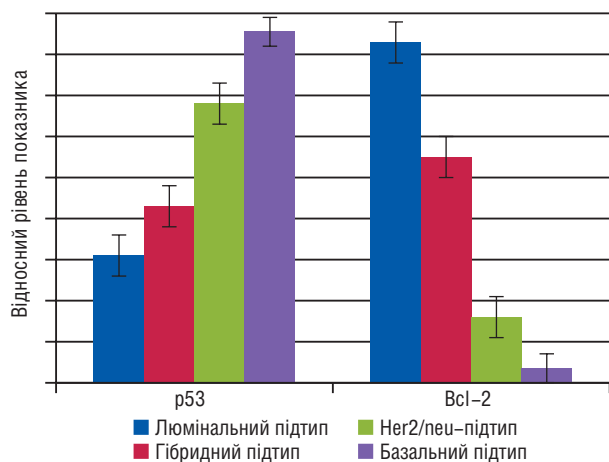


Рис. 5. Кореляція між молекулярним профілем пухлини та експресією регуляторів апоптозу (p53 та Bcl-2)

Отримані дані підтверджують імунофенотипічну гетерогенність інвазивного протокового РМЗ і вплив молекулярного профілю пухлини на прогноз перебігу захворювання. На це вказують кореляційні зв'язки між значенням НПІ та рівнем експресії рецепторів стероїдних гормонів, Bcl-2, рівнем проліферації в пухлині.

Гетерогенність та її клінічне значення стали основою для молекулярної класифікації РМЗ [4]. Так, найбільшу групу формують пухлини з позитивним статусом рецепторів стероїдних гормонів, що відповідає люмінальному підтипу. В описаному дослідженні такі пухлини мали зазвичай низьке значення НПІ; негативний статус Her2/neu та p53; низький рівень ядерної експресії субодиниць NF- $\kappa$ B та проліферації; високий рівень експресії Bcl-2 і E-cadherin. Такий молекулярний профіль свідчить про збереження клітиною адгезивних властивостей, здатності до апоптозу та чутливості до гормональної терапії, що асоціюється з менш агресивною поведінкою пухлини та узгоджується з літературними даними щодо сприятливого прогнозу перебігу захворювання у пацієнтів із таким імунофенотипом.

Іншу групу становлять пухлини з позитивним статусом рецепторів стероїдних гормонів та Her2/neu, що за молекулярною класифікацією належать до гібридного підтипу. У нашому дослідженні такі пухлини мали різний ступінь диференціювання, характеризувалися широкою варіацією рівня експресії всіх досліджуваних маркерів. У результаті ці пухлини можна розцінювати як помірно агресивні, що узгоджується з даними літератури щодо проміжного прогнозу перебігу захворювання у таких пацієнтів.

В останню велику групу входять рецепторнегативні пухлини (ER-PR-). Серед них одна частина є Her2/neu-ампліфікованими (Her2/neu-підтип), а інша — Her2/neu-негативними (базальний підтип), але вони часто мають спільні характеристики. У нашому дослідженні такі підтипи пухлин були зазвичай низькодиференційованими, мали позитивний статус p53, високий рівень проліферації, низький рівень

експресії Vcl-2 та E-cadherin, високе значення НПІ. Крім цього, виявлено, що такі пухлини часто характеризуються високим рівнем ядерної експресії обох субодиниць NF- $\kappa$ B, що призводить до його активації та впливу на транскрипцію генів-мішеней. Усі ці характеристики можуть пояснювати дані літератури щодо підвищеної злоякісності рецепторнегативних пухлин, їх резистентності до хіміотерапії та несприятливого прогнозу перебігу захворювання.

Таким чином, незважаючи на те що основою для вибору тактики лікування залишається визначення статусу рецепторів стероїдних гормонів та Her2/neu, доцільним є розширення спектра досліджуваних маркерів, оскільки вони будуть надавати додаткову інформацію про пухлину та сприяти індивідуалізації терапевтичних схем. Так, згідно з результатами, одержаними нами, підвищення рівня експресії ODC у пухлині корелювало з позитивним статусом p53 та високим рівнем експресії E-cadherin. Механізм формування цих взаємозв'язків та їх біологічне значення є суперечливими і потребують подальших досліджень.

Встановлено також, що найвищий рівень NF- $\kappa$ B у пухлинах асоціювався з негативним статусом рецепторів стероїдних гормонів (ER-PR-). Такий взаємозв'язок вказує на те, що активація NF- $\kappa$ B у пухлинах молочної залози відбувається за гормоннезалежним механізмом канцерогенезу і, можливо, є одним із найважливіших етапів злоякісної трансформації клітини. Як наслідок, такі пацієнти є нечутливими до гормональної терапії (через відсутність експресії ER та PR), мають підвищену хіміорезистентність (через високий рівень експресії субодиниць NF- $\kappa$ B) та поганий прогноз перебігу хвороби.

Взаємозв'язок між експресією NF- $\kappa$ B та Her2/neu був неоднозначним. З одного боку, високий рівень субодиниць NF- $\kappa$ B корелював із позитивним статусом Her2/neu, а з іншого — найвищий рівень експресії p65-субодиниці NF- $\kappa$ B було виявлено в базальноподібному підтипі пухлини. Такі розбіжності можуть вказувати на те, що активація NF- $\kappa$ B не залежить від статусу Her2/neu, а їх кореляція опосередкована взаємозв'язком NF- $\kappa$ B із рецепторами стероїдних гормонів та/чи іншими маркерами. Окрім цього, пухлини з активованим NF- $\kappa$ B зазвичай мали низький рівень експресії Vcl-2 та позитивний статус p53, що призводить до інактивації системи апоптозу та вибуття пухлинної клітини з-під імунного нагляду. Як наслідок, підвищується проліферативна активність пухлини, що підтверджується прямим кореляційним зв'язком між рівнем експресії субодиниць NF- $\kappa$ B і відсотком клітин, позитивних до маркера Ki-67. Вищенаведені дані опосередковано свідчать про поганий прогноз і хіміорезистентність пухлин з активованим NF- $\kappa$ B, що додатково підтверджується виявленням прямим кореляційним зв'язком між рівнем експресії NF- $\kappa$ B та значенням НПІ. Однак це потребує подальших досліджень і ретроспективного аналізу великої вибірки пацієнтів.

## ВИСНОВКИ

Виявлено, що профіль експресії субодиниць NF- $\kappa$ B (p50 і p65) перебуває в оберненому кореляційному зв'язку з рівнем експресії ER, PR та Vcl-2, а також у прямому — зі значенням НПІ та статусом Her2/neu. Це свідчить про те, що активація NF- $\kappa$ B пов'язана з гормоннезалежним шляхом канцерогенезу та асоціюється з несприятливим прогнозом перебігу захворювання.

Виявлено прямий взаємозв'язок між рівнем експресії ODC і рівнями p53 і E-cadherin, механізм формування та біологічне значення якого є суперечливими та потребують подальших досліджень.

Встановлено, що показник НПІ, рівень проліферації та експресії p65-субодиниці NF- $\kappa$ B зростають у напрямі люмінальний  $\rightarrow$  гібридний  $\rightarrow$  Her2/neu  $\rightarrow$  базальний підтип PM3, що підтверджує численні дані щодо несприятливого прогностичного значення базального підтипу пухлин і вказує на важливу роль активації NF- $\kappa$ B у формуванні їх агресивної поведінки.

Показано підвищення рівня накопичення p53 та зниження рівня експресії Vcl-2 в напрямі люмінальний  $\rightarrow$  гібридний  $\rightarrow$  базальний  $\rightarrow$  Her2/neu-підтип PM3, що вказує на розрегулювання механізмів апоптозу в пухлинах із Her2/neu та базальним підтипом.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Федоренко ЗП, Гуляк ЛО, Михайлович ЮЙ та ін. Рак в Україні 2011–2012. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцер-реєстру 2013; **14**: 8, 46–47.
2. Рак в Україні, 2008–2009. Захворюваність, смертність, показники діяльності онкологічної служби. Бюл Нац канцер-реєстру України, 2010; (11): 117.
3. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population based study. Proc Natl Acad Sci USA 2003; **100**: 10393–8.
4. Tang P, Skinner KA, Hicks DG. Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? Diagn Mol Pathol 2009; **18**: 125–32.
5. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications, 3rd ed. Philadelphia: Saunders (Elsevier Science), 2010. 941 p.
6. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; **100**: 57–70.
7. Meteoglu I, Erdogdu 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. Montagut C, Tusquets I, Ferrer B, *et al.* Activation of nuclear factor- $\kappa$ B is linked to resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Endoc Related Cancer 2006; **13** (2): 606–16.
9. Mayo MW, Wang CY, Cogswell PC, *et al.* Requirement of NF-kappaB activation to suppress p53-independent apoptosis induced by oncogenic Ras. Science 1997; **278**: 1812–5.
10. Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. Science 1996; **274**: 782–4.
11. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, *et al.* Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. Science 1996; **274**: 787–9.
12. Бердинских НК, Залеток СП. Полиамины и опухолевый рост. Киев: Наук думка, 1987. 141 с.

13. Manni A, Gimotty P, Badger B. Prognostic influence on survival of increased ornithine decarboxylase activity in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1901–6.
14. Kubo S, Tamori A, Nishiguchi S, *et al.* Relationship of polyamine metabolism to degree of malignancy of human hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 1998; 5: 1385–8.
15. Thomas T, Balabhadrapathruni S, Gallo M, *et al.* Development of polyamine analogs as cancer therapeutic agents. *Oncol Res* 2002; 13: 123–35.
16. Шпонька ИС, Бондарева ВА, Грищенко ПА. Роль тканевых маркеров в оценке биологических свойств и прогнозе течения рака молочной железы. *Международный журнал* 2005; 2: 97–104.
17. Haybittle JL, Blamey RW, Elston CW, *et al.* A prognostic index in primary breast cancer. *Br J Cancer* 1982; 45 (3): 361–6.
18. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, *et al.* The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1992; 22(3): 207–19.
19. Okugawa H, Yamamoto D, Uemura Y, *et al.* Prognostic factors in breast cancer: the value of the Nottingham Prognostic Index for patients treated in a single institution. *Surg Today* 2005; 35 (11): 907–11.
20. Bozzetti C, Nizzoli R, Nadia N, *et al.* Bcl-2 expression on fine needle aspirates from primary breast carcinoma: correlation with other biologic markers. *Cancer* 2000; 87 (4): 224–30.
21. Шпильова СІ, Юрченко ОВ, Волкова КД та ін. Прогностичне значення пухлиноасоційованих молекулярних маркерів у хворих на рак молочної залози з різним фенотипом лікарської резистентності. *Онкологія* 2007; 9 (2): 110–4.
22. Щепотин ИБ. Клинико-биологические особенности трижды негативного рака грудной железы. *Клиническая онкология* 2012; 5 (1): 55–8.

#### FEATURES OF NF- $\kappa$ B AND ODC EXPRESSION IN TUMORS OF PATIENTS WITH BREAST CANCER WITH DIFFERENT MOLECULAR PROFILES

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

**Summary.** *Aim:* to investigate the expression of transcription factor NF- $\kappa$ B (p50 and p65), ER, PR, Her2/neu, Ki-67, p53, Bcl-2, E-cadherin and ODC in tumor tissue of patients with breast cancer. *Methods:* the ex-

pression of molecular markers were investigated by immunohistochemistry on formalin fixed, paraffin embedded tissue of 132 patients with invasive ductal carcinoma. **Results:** the inverse correlation of the Nottingham prognostic index (NPI) with level of steroid hormone receptors (ER and PR) and Bcl-2 expression, and direct correlation — with level of tumor proliferation was defined. The direct correlation between the level of expression of ODC and levels of p53 and E-cadherin was shown. The study of relation between morphological and molecular features of tumor and NF- $\kappa$ B expression profile established that the highest level of NF- $\kappa$ B subunits (p50 and p65) was associated with a negative status of ER and PR, overexpression of Her2/neu, low levels of Bcl-2, and the high value of the NPI. Analysis of tumors with different molecular subtype showed that Her2/neu-positive and basal subtypes are characterized by significantly higher values of NPI, proliferation level, expression of p53 and p65-subunit of NF- $\kappa$ B and the lower level of Bcl-2 compared with luminal and hybrid subtypes. **Conclusion:** 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, Ki-67, p53, Bcl-2, E-cadherin, ODC, 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

Одержано: 8.10.2013