

С.О. Собченко<sup>1</sup>  
 Н.Ю. Лук'янова<sup>2</sup>  
 В.М. Базась<sup>1</sup>  
 Т.В. Задворний<sup>2</sup>  
 О.М. Ключов<sup>1</sup>  
 В.Ф. Чехун<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Київський міський клінічний онкологічний центр

<sup>2</sup>Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

**Ключові слова:** рак молочної залози, молекулярно-біологічні особливості, лактоферин.

## ЗВ'ЯЗОК ПОКАЗНИКІВ ЛАКТОФЕРИНУ З МОЛЕКУЛЯРНО-БІОЛОГІЧНИМИ ОСОБЛИВОСТЯМИ ЗЛОЯКІСНИХ НОВОУТВОРЕНЬ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

**Мета:** проаналізувати залежність показників лактоферину (ЛФ) у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих від статусу експресії молекулярно-біологічних маркерів у клітинах раку молочної залози (РМЗ) та показників виживаності. **Об'єкт і методи:** дослідження проведено на клінічному матеріалі 151 хворої на РМЗ I–II стадій з використанням клінічних, морфологічних, імуногістохімічного, імуноферментного та статистичних методів. **Результати:** встановлено гетерогенність показників ЛФ на рівні пухлини та організму у хворих на РМЗ. Визначено існування достовірного кореляційного зв'язку між вмістом ЛФ у сироватці крові та його експресією в пухлинних клітинах з такими молекулярно-біологічними характеристиками РМЗ, як статус експресії рецепторів естрогену (РЕ) та прогестерону (РП) ( $r = -0,53$  та  $r = -0,61$  відповідно), а також проліферативна активність пухлинних клітин ( $r = 0,57$  та  $r = 0,49$  відповідно). Виявлено, що загальна 5-річна виживаність хворих на РМЗ є достовірно меншою у пацієнтів за наявності експресії ЛФ, відсутності експресії РЕ і РП та високого проліферативного потенціалу пухлинних клітин. **Висновки:** отримані дані розширюють існуючі уявлення щодо асоціації порушень метаболізму залізов'язуючих білків у пухлинних клітинах та організмі хворих зі ступенем злоякісності РМЗ; свідчать про можливість використання показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах для інтегральної оцінки і поглибленої характеристики пухлинного процесу в молочній залозі.

Рак молочної залози (РМЗ) знаходиться на другому місці за поширеністю серед усіх злоякісних пухлин і є найбільш частим онкологічним захворюванням у жінок [1–5]. Щорічно в світі реєструється близько 2,2 млн нових випадків РМЗ, що визначає його як гостру соціальну і медичну проблему у зв'язку з високою смертністю серед жіночого населення. Згідно з даними ВООЗ, у 2020 р. хвороба забрала життя 684 996 осіб. Найбільш гостро ця проблема стоїть у Західній Африці (середній показник летальності вищий за 23 випадки на 100 тис. населення), а також в Малайзії (20,7 на 100 тис. населення). Досить високий рівень смертності й у розвинених країнах світу: у Центральній Європі він становить 17,4 на 100 тис. населення, у Західній Європі — 15,0 на 100 тис. населення, в Північній Америці — 12,8 на 100 тис. населення, тоді як у Східній Азії цей показник набагато нижчий — 9,6 на 100 тис. населення [1]. 5-річна виживаність при РМЗ між країнами істотно різниться — від 95% і більше в Північній Америці, Швеції та Японії,

до 60% в країнах із середнім рівнем доходу і менше 40% в країнах з низьким рівнем доходу [6].

Така ситуація зумовлена пізньою діагностикою, адже в 40% випадків РМЗ діагностують на розповсюджених стадіях, а також значною клінічною та молекулярною гетерогенністю новоутворень [7]. Виділяють 20 гістологічних, 8 молекулярно-генетичних, 6 геномних підтипів РМЗ, які характеризуються специфічними молекулярними і/або біохімічними властивостями, варіабельним клінічним перебігом і різною ефективністю лікування [8].

Шляхи пошуку вирішення цієї вкрай актуальної проблеми потребують нових підходів для вирішення таких нагальних питань, як рання діагностика, прогнозування перебігу хвороби, а також персоналізоване лікування хворих. Велике значення в діагностиці і лікуванні РМЗ на сьогодні мають біологічні маркери, які визначаються безпосередньо в пухлинній тканині. Ці маркери характеризують індивідуальні особливості пухлини: схильність до інвазії, метастазування, гормональну чутливість тощо [9]. Уточнення

молекулярно-біологічних і патогенетичних характеристик РМЗ дозволяє ближче підійти до індивідуалізації системної терапії і в ряді випадків відмовитися від свідомо неефективного, токсичного і високовартісного лікування.

Враховуючи зазначене, нові погляди на виникнення, розвиток та прогресію РМЗ, зумовлені ідентифікацією змін вмісту, співвідношення та розподілу залізозв'язаних білків та їх рецепторів у нормальних та злоякісних клітинах, можуть лягти в основу успішної корекції терапії з урахуванням численних особливостей новоутворення [10, 11].

Відомо, що на клітинному та молекулярному рівнях регуляція обміну заліза забезпечується через злагоджену дію залізозв'язаних білків, у тому числі білків-переносників. Перенесення заліза у зв'язаній з білками формі мінімізує його здатність брати участь у реакціях вільно-радикального окиснення, а отже, знижує ймовірність оксидативного ушкодження клітин і тканин організму [11–14]. На сьогодні вже існує достатньо інформації про особливості метаболізму таких залізозв'язаних білків, як феритин, трансферин, феропортин у жінок зі злоякісними новоутвореннями молочної залози, пропозиції та перші кроки застосування отриманих даних у клінічній практиці [15, 16].

Найменш вивченою у патогенезі, клінічному перебігу та прогнозі РМЗ залишається роль лактоферину (ЛФ). ЛФ — це залізозв'язуючий глікопротеїн родини трансферинів, який виконує численні функції. Рецептор ЛФ відіграє важливу роль у процесі інтерналізації ЛФ і полегшує адсорбцію іонів заліза, зв'язаних з ЛФ. Поряд із цим ЛФ регулює концентрацію іонів заліза в крові і секретах, має антимікробну та антивірусну дію, його вважають одним з найбільш важливих імунних факторів молока. ЛФ взаємодіє з поліамінами та гепарином. Цей глікопротеїн бере безпосередню участь у захисних реакціях організму, може бути посередником під час розвитку клітинного імунітету. Володіє антиоксидантною, імуномодуючою та протипухлинною активністю. Проникаючи у ядра клітин, він зв'язується зі специфічними послідовностями ДНК і активує процеси транскрипції. Механізм дії ЛФ як фактора транскрипції не досліджений, а потенційні гени-мішені на сьогодні не відомі. Ймовірно, розвиток досліджень у цьому напрямку з часом призведе до розуміння біологічної ролі унікальної властивості ЛФ — взаємодії з великою кількістю різних клітин [17–20].

Аспекти значення ЛФ у клінічному перебігу РМЗ практично не вирішені. Існують лише поодинокі і в той же час суперечливі повідомлення стосовно вивчення ЛФ у пухлинних клітинах хворих на РМЗ в системі *in vitro*. Серед них дані експериментальних досліджень щодо здатності ЛФ підвищувати міграцію та інвазію клітин як тричі рецептор-позитивних, так і рецептор-негативних ліній РМЗ [21]. З іншого боку, показано, що ЛФ молока корів здатний зменшувати життєздатність клітин ліній HS578T і T47D на 47

і 54% відповідно, а також індукувати підвищення рівня апоптозу [22, 23]. Іншими дослідниками встановлено антиканцерогенну дію рекомбінантного ЛФ людини на пухлинні клітини в системі *in vitro* [24, 25].

Отже, до цього часу не існує певного погляду на роль ЛФ у патогенезі РМЗ: не визначені особливості кореляційних зв'язків між морфологічними і молекулярно-біологічними характеристиками на різних стадіях розвитку захворювання. Обмаль відомостей про значення ЛФ як критерію прогнозу клінічного перебігу РМЗ, хоча, згідно із сучасними тенденціями в онкології, діагностично-прогностичні критерії мають ґрунтуватися на молекулярно-генетичних та імуногістохімічних маркерах, які відображають особливості розвитку пухлинного процесу на системному рівні. З огляду на сказане вище, метою роботи було: проаналізувати залежність показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих від статусу експресії молекулярно-біологічних маркерів у клітинах РМЗ та від показників виживаності хворих.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В основу роботи покладено ретроспективний аналіз результатів обстеження, лікування і виживаності 151 хворої на РМЗ стадій I–II, які перебували на лікуванні у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2013 р. 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-те видання) [26].

Для верифікації пухлинного процесу проведено гістологічне дослідження операційного матеріалу. Загальну структуру пухлин оцінювали під час перегляду гістологічних зрізів товщиною 4–5 мікрон, забарвлених гематоксиліном та еозином, верифікували клінічний діагноз за Міжнародною класифікацією пухлин молочної залози (2009) та оцінювали ступінь диференціювання РМЗ [27].

Згідно з даними історій хвороб, усім пацієнткам проведено загальні клінічні, біохімічні, лабораторні обстеження, ультразвукову діагностику органів черевної порожнини, мамографію, рентгеноскопію органів грудної порожнини, пункційну біопсію пухлин молочної залози за стандартами діагностики і лікування онкологічних хворих, затвердженими наказами МОЗ України від 27.07.1998 р. № 140, від 17.09.2007 р. № 554, від 30.07.2010 р. № 645 та від 30.06.2015 р. № 396.

Вік пацієнток коливався від 28 до 89 років (середній вік  $56,5 \pm 9,6$  років) (табл. 1). Серед обстежених більшу кількість становили хворі на РМЗ II стадії — 68,9%. У 80,8% хворих відмічали менопаузу, у 19,2% пацієнток менструальна функція збережена. Метастатичні ураження регіонарних лімфатичних вузлів діагностовані у 27,8% пацієнток, віддалені метастази при комплексному обстеженні хворих до хірургічного лікування не були діагностовані.

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

Таблиця 1

Клініко-патологічна характеристика хворих на РМЗ I–II стадій

Показники	Кількість хворих	
	n	%
Загальна кількість хворих	151	100
Середній вік, роки	56,5 ± 9,6	
Діапазон віку, роки	28–89	
<b>Менструальна функція</b>		
Менструальний цикл збережений	29	19,2
Менопауза	122	80,8
<b>Стадія пухлинного процесу</b>		
I	47	31,1
II	104	68,9
<b>Наявність метастазів в регіонарних лімфатичних вузлах</b>		
N0	103	68,2
N1	42	27,8
Nx	6	4,0
<b>Гістологічний тип новоутворення</b>		
Інфільтративний протоковий рак	101	66,9
Інфільтративний дольковий рак	50	33,1
<b>Ступінь диференціювання новоутворення</b>		
Ступінь диференціювання G1 (високий)	42	27,8
Ступінь диференціювання G2 (помірний)	78	51,7
Ступінь диференціювання G3 (низький)	31	20,5
<b>Молекулярний підтип</b>		
Люмінальний А	81	53,6
Люмінальний Б	35	23,2
Базальний	35	23,2

Грунтуючись на результатах імуногістохімічного дослідження експресії рецепторів естрогену (РЕ), прогестерону (РП) та епідермального фактора росту (Her2/neu) та Ki-67 усі досліджувані зразки пухлинної тканини нами було розділено на 3 молекулярні підтипи: люмінальний А (53,6%); люмінальний Б (23,2%); базальний (або тричі негативний) (23,2%).

Неоад'ювантну поліхіміотерапію (ПХТ) хворим не призначали. Усім пацієнткам проведено хірургічне лікування (квадрант- або лампектомія з регіональною лімфодисекцією, радикальна мастектомія за Маденом). В ад'ювантному режимі проводили ПХТ за схемами, які застосовують у хворих на РМЗ: CMF (циклофосфамід, метотрексат, флуороурацил), CAF (циклофосфамід, доксорубіцин, флуороурацил), 4–6 курсів. Після операції проводили променеву терапію на післяопераційний рубець, пахвову, парастернальну та надключичну ділянки (апарат «TERAGAM», разова вогнищева доза — 2 Гр, сумарна вогнищева доза — 42–44 Гр). Хворим із позитивною експресією гормональних рецепторів у видаленій пухлині на тривалий час призначали гормональну терапію за прийнятими схемами (тамоксифен, інгібітори ароматази) залежно від індивідуальних клінічних даних.

*Метод твердофазного імуноферментного аналізу.* Визначення вмісту ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ було проведено методом твердофазного імуноферментного аналізу за допомогою автоматично-

го біохімічного та імуноферментного аналізатора Chem Well 2900 згідно з введеною програмою протоколу до наборів Human Lactoferrin AssayMax ELISA Kit (AssayPro, USA). Зразки сироватки крові для дослідження не містили ознак гемолізу та їх отримували відповідно до рекомендацій, зазначених в інструкціях до наборів.

*Імуногістохімічний метод.* Імуногістохімічне дослідження ЛФ, РЕ, РП, Her2/neu і Ki-67 у клітинах РМЗ проводили на парафінових зрізах операційного матеріалу. У якості первинних антитіл використовували моноклональні антитіла, які є специфічними до ЛФ (клон JE49–60), РЕ (клон 1D5), РП (PgR636), Her2/neu (клон c-erbB-2) та Ki-67 (клон MIB-1). Для детекції реакції використовували систему візуалізації Lab Vision™ UltraVision™ Quanto Detection System (Thermo Scientific, USA). Для кількісної оцінки експресії досліджених маркерів використовували метод H-Score за формулою:

$$S = N_0 (\%) + 3 \times N_1 (\%) + 2 \times N_2 (\%) + 1 \times N_3 (\%),$$

де S — показник «H-Score»,  $N_0$  — кількість клітин з відсутньою експресією,  $N_1$ ,  $N_2$  та  $N_3$  — з низькою, середньою та високою експресією, відповідно. Кінцевий результат підрахунку виражали у балах: від 1 до 100 балів — низький, від 101 до 200 балів — середній, від 201 до 300 — високий рівень експресії [28].

*Статистичні методи.* Статистичну обробку отриманих результатів виконували за допомогою програми GraphPad Prism, v.6.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) з урахуванням характеру розподілу отриманих даних. Порівняння двох незалежних груп за кількісною ознакою проводили з використанням U-критерію Манна — Уїтні. Аналіз спряженості ознак проводили з використанням методу Хі-квадрат. Оцінку зв'язку експресії досліджуваних маркерів з клініко-патологічними характеристиками РМЗ проводили з використанням коефіцієнту кореляції Пірсона. Вживаність хворих аналізували за методом Каплана — Мейера (log-rank test). Дані представлені у вигляді  $M \pm m$ , де M — середнє арифметичне, m — стандартна помилка середнього або у вигляді відсоткового співвідношення для відносних величин. Критичний рівень статистичної значимості приймали рівним 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження вмісту ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ стадій I–II виявило значну варіабельність показників цього маркера з індивідуальними коливаннями від 125,1 нг/мл до 3810,0 нг/мл (середній показник  $1486,7 \pm 427,6$  нг/мл). Показники ЛФ, які достовірно перевищували максимальні референтні значення, встановлено у 87 (57,6%) хворих на РМЗ, тоді як у 64 (42,4%) пацієнток вони були у межах референтних значень. Аналіз результатів імуногістохімічного визначення експресії ЛФ у пухлинній тканині показав, що частота пухлин з позитивною детекцією продукту реакції становила 79,0% (рис. 1). Високий, середній та низький рівні експресії дослі-

джуваного маркера констатовано у цитоплазмі клітин відповідно 40,0, 27,0 та 12,0% хворих на РМЗ. Таким чином, встановлена варіабельність експресії ЛФ у пухлинних клітинах та ідентифіковані відмінності вмісту ЛФ у сироватці крові більшості досліджених пацієнток є підтвердженням участі цього протеїну у патогенезі РМЗ.

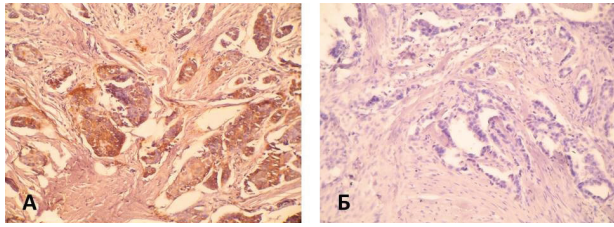


Рис. 1. Наявність (а) та відсутність (б) експресії ЛФ у клітинах РМЗ. Імуногістохімія, дозabarвлено гематоксіліном,  $\times 400$

Оскільки сьогодні в основі визначення тактики лікування РМЗ лежить молекулярно-генетична класифікація, на наступному етапі нами було проведено аналіз показників експресії ЛФ в пухлинній тканині та сироватці крові хворих на РМЗ залежно від молекулярного підтипу новоутворень. За результатами оцінки рівня ЛФ у сироватці крові нами встановлено, що у хворих із люмінальним А підтипом вміст цього протеїну був у 1,3 ( $p < 0,05$ ) та 2,0 ( $p < 0,05$ ) раза меншим, ніж у хворих із люмінальним Б та базальним підтипом РМЗ (табл. 2). Під час аналізу результатів імуногістохімічного дослідження меншу частоту ( $p < 0,05$ ) ЛФ-позитивних новоутворень детектовано у хворих із люмінальним А та люмінальним Б молекулярним підтипами (67,9 та 82,9% хворих відповідно) порівняно з хворими з базальним молекулярним підтипом (97,1%) РМЗ. Слід відзначити, що пухлини базального молекулярного підтипу характеризувалися лише високим рівнем експресії ЛФ ( $> 200$  балів H-Score).

Таблиця 2

Показники сироваткового та пухлинного ЛФ залежно від молекулярного підтипу РМЗ

Молекулярний підтип	Показники ЛФ		
	Рівень у сироватці крові (нг/мл)	Рівень експресії в пухлинній тканині (бали H-Score)	Кількість хворих із ЛФ-позитивними пухлинами (n/%)
Люмінальний А	1078,7 $\pm$ 77,1	178,0 $\pm$ 11,3	55/67,9
Люмінальний Б	1388,5 $\pm$ 62,1*	210,0 $\pm$ 10,6	29/82,9
Базальний	2161,5 $\pm$ 90,4*	254,0 $\pm$ 9,7*	34/97,1*

Примітка: \*  $p < 0,05$  у порівнянні з відповідними характеристиками хворих на РМЗ даної категорії.

Таким чином, достовірне підвищення показників ЛФ у сироватці крові та пухлинній тканині ( $r = 0,61$  та  $0,59$ ,  $p < 0,05$ ) відмічено у хворих з базальним молекулярним підтипом РМЗ, який за клініко-патологічними показниками характеризується високим ступенем злоякісності.

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку показників вмісту ЛФ у сироватці крові та статусу експресії ЛФ у пухлинній тканині з молекулярним підтипом РМЗ, наступним етапом досліджень було з'ясування закономірностей між наявністю цього протеїну

в клінічному матеріалі хворих та деякими ключовими маркерами, що визначають молекулярний підтип пухлини — РЕ, РП і Ki-67. Найбільш високий рівень ЛФ виявлено у сироватці крові хворих на РМЗ із негативним рецепторним статусом стероїдних гормонів у пухлинних клітинах порівняно з таким у пацієнтів, пухлини яких експресують обидва досліджувані рецептори (РЕ і РП) ( $2254,3 \pm 82,6$  проти  $1156,6 \pm 78,0$  нг/мл,  $p < 0,05$ ) (рис. 2). За наявності експресії одного з рецепторів стероїдних гормонів вміст ЛФ у сироватці крові знаходився в діапазоні від 1630,0 до 2280,0 нг/мл. У хворих із високою та середньою проліферативною активністю пухлинних клітин, яка визначалася за рівнем експресії Ki-67, вміст сироваткового ЛФ був у 1,6 ( $p < 0,05$ ) та 1,3 ( $p < 0,05$ ) раза вищим порівняно з таким у пацієнток із новоутвореннями, що мали низький проліферативний потенціал (див. рис. 2).

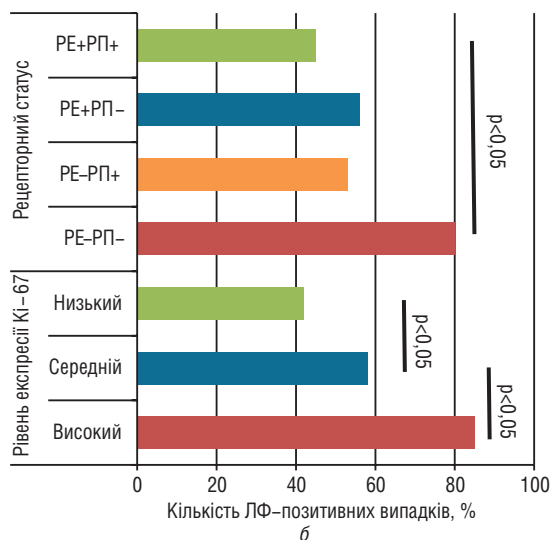
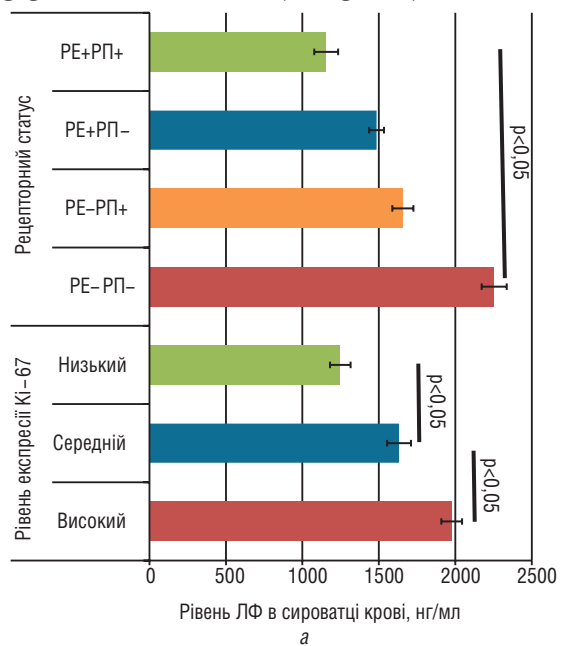


Рис. 2. Рівень ЛФ у сироватці крові (а) та наявність експресії ЛФ у пухлинній тканині (б) хворих на РМЗ залежно від рецепторного статусу та проліферативної активності новоутворень

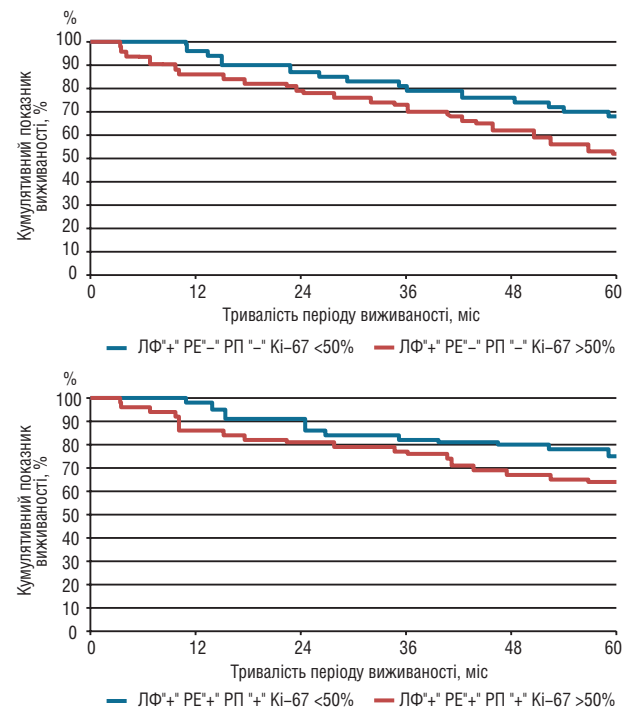
Аналогічну спрямованість нами виявлено під час аналізу зв'язку показників експресії ЛФ у пухлинних клітинах із рецепторним статусом та проліферативною активністю РМЗ. Найбільшу кількість ЛФ-негативних новоутворень визначено у хворих на РМЗ з наявністю у пухлинних клітинах експресії обох рецепторів стероїдних гормонів (45,0% випадків) та за наявності експресії РЕ (56,3% випадків) ( $p < 0,05$ ). З'ясовано, що експресія ЛФ більш характерна для новоутворень молочної залози із високим або середнім рівнем експресії Ki-67 у пухлинних клітинах ( $p < 0,05$ ) (див. рис. 2).

Під час співставлення показників експресії ЛФ у пухлинних клітинах із рецепторним статусом і проліферативною активністю РМЗ виявлено, що високий рівень експресії ЛФ ( $>200$  балів) визначається лише в новоутвореннях із негативним рецепторним статусом (РЕ<sup>-</sup>, РП<sup>-</sup>) та високою експресією Ki-67. Статистичний аналіз дозволив встановити, що підвищення показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах прямо корелює з проліферативною активністю РМЗ ( $r = 0,57$  та  $r = 0,49$  відповідно) та зворотню корелює зі статусом експресії рецепторів стероїдних гормонів у пухлинних клітинах ( $r = -0,53$  та  $r = -0,61$  відповідно).

Враховуючи отримані дані щодо зв'язку експресії ЛФ зі статусом експресії РЕ і РП, а також проліферативною активністю новоутворень, було проаналізовано загальну виживаність (ЗВ) хворих на РМЗ з урахуванням показників експресії зазначених маркерів. Як видно з наведених даних (рис. 3), достовірне зниження показників 5-річної ЗВ на 16,9% виявлено у хворих, пухлинні клітини яких експресують ЛФ, мають негативний статус експресії РЕ, РП та високий проліферативний потенціал (експресія Ki-67 у понад 50% пухлинних клітин), порівняно з пацієнтами з молекулярним профілем пухлини ЛФ<sup>+</sup>, РЕ<sup>-</sup>, РП<sup>-</sup> та низьким проліферативним потенціалом (експресія Ki-67 у менш ніж 50% пухлинних клітин). Натомість у хворих з позитивним статусом експресії рецепторів стероїдних гормонів за наявності ЛФ-позитивних новоутворень виявлено лише тенденцію до зниження показників 5-річної ЗВ пацієнтів залежно від проліферативного потенціалу РМЗ.

Таким чином, ми встановили зв'язок показників ЛФ з молекулярним профілем РМЗ. Найвищий рівень ЛФ зареєстровано у сироватці крові та пухлинних клітинах хворих із рецептор-негативним (РЕ<sup>-</sup>, РП<sup>-</sup>) РМЗ, що відрізняється високою проліферативною активністю. Встановлено, що найменша 5-річна ЗВ спостерігається серед хворих на РМЗ за наявності експресії ЛФ у рецептор-негативних пухлинних клітинах на тлі високої експресії Ki-67. Отримані результати вказують, що ЛФ може бути використаний в якості об'єктивного критерію визначення агресивності перебігу базального підтипу РМЗ, що дозволить забезпечити поліпшення результатів лікування цього контингенту хворих.

Отже згідно з отриманими даними високий рівень експресії ЛФ асоційований з відсутністю гормональних рецепторів у пухлинних клітинах, що узгоджується з результатами дослідження D. Schuls та співавторів. З використанням мас-спектрометрії авторами було встановлено значне підвищення рівня експресії ЛФ у тканині тричі рецептор-негативного РМЗ [29]. Крім того, R. Rossiello та співавтори показали, що більш ніж у 50% досліджених хворих на РМЗ концентрація ЛФ у периферичній крові перевищувала верхню межу норми [30]. Варто зауважити, що у публікаціях інших авторів також отримано дані, які свідчать про кореляцію експресії ЛФ у пухлинних клітинах з наявністю РЕ, а рівень ЛФ у крові хворих на РМЗ асоціюється зі зниженням концентрації естрадіолу, що ще раз підтверджує його роль в регуляції експресії ЛФ [31]. Таким чином, отримані нами результати можуть вказувати на естроген-незалежний шлях регуляції експресії ЛФ.



**Рис. 3.** Загальна виживаність хворих на РМЗ залежно від експресії ЛФ у пухлинній тканині, статусу експресії РЕ, РП та проліферативної активності пухлинних клітин (оцінка за Капланом — Мейером, log-rank тест,  $p < 0,05$ )

Встановлені нами кореляційні зв'язки між рівнем експресії ЛФ та проліферативним потенціалом РМЗ можна пояснити, виходячи з наявної в науковій літературі інформації, згідно з якою цей глікопротеїн бере участь у регуляції експресії ендотеліну-1, зв'язуючись з промоторною ділянкою його гена. Ендотелін-1 є фактором, який підтримує проліферацію злоякісно трансформованих клітин, інвазію, ангиогенез та неоваскуляризацію [32].

Підсумовуючи отримані результати, можемо стверджувати, що нами з'ясовано ряд нових наукових аспектів щодо молекулярно-біологічного значення ЛФ при РМЗ. Обґрунтовано можливість ви-

користання показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах для інтегральної оцінки та поглибленої характеристики пухлинного процесу у молочній залозі. Виявлені кореляції між значеннями ЛФ у пухлинних клітинах та сироватці крові хворих з такими показниками злоякісності РМЗ, як молекулярний підтип, їх рецепторний статус та проліферативний потенціал, свідчать про потенційну можливість їх використання для прогнозування агресивності перебігу пухлинного процесу.

## ВИСНОВКИ

1. Рівень ЛФ у сироватці крові хворих на РМЗ знаходиться в межах від 125,1 нг/мл до 3810,0 нг/мл та достовірно перевищує максимальні референтні значення ( $p < 0,05$ ) у 57,6% випадків. Найвищі показники вмісту ЛФ у сироватці крові виявляються у пацієнток з базальним молекулярним підтипом новоутворень ( $r = -0,61$ ;  $p < 0,05$ ).

2. Встановлено гетерогенність експресії ЛФ у пухлинних клітинах хворих на РМЗ. Найменшу кількість ЛФ-позитивних пухлин зафіксовано при люмінальному А підтипі, в усіх досліджених випадках базального молекулярного підтипу РМЗ визначено високий рівень експресії ЛФ ( $>200$  балів H-Score).

3. Виявлено достовірний кореляційний зв'язок між вмістом ЛФ у сироватці крові та його експресією в пухлинних клітинах з такими молекулярно-біологічними характеристиками РМЗ, як статус експресії РЕ і РП ( $r = -0,53$  та  $r = -0,61$  відповідно) та проліферативна активність клітин ( $r = 0,57$  та  $r = 0,49$  відповідно).

4. Загальна 5-річна ЗВ хворих на РМЗ є достовірно меншою за наявності експресії ЛФ, відсутності експресії РЕ і РП, високого проліферативного потенціалу пухлинних клітин.

5. Обґрунтовано можливість використання показників ЛФ у сироватці крові та пухлинних клітинах для поглибленої характеристики пухлинного процесу та прогнозування агресивності перебігу РМЗ.

Робота виконана за підтримки науково-дослідних робіт за темами: «Роль лактоферину в ініціації та перебігу найбільш розповсюджених гормонзалежних злоякісних новоутворень» (2016–2018 рр., № держреєстрації 0115U005381), «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонзалежних пухлин» (2017–2021 рр., № держреєстрації 0117U002034).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians 2021; **71** (3): 209–49.  
2. Cancer in Ukraine, 2019–2020. Incidence, mortality, activities of oncological service. Bull Nat Cancer Registry Ukr, № 22, Kyiv, 2020. 82 p.

3. Smolanka II, Aksenov AA, Aksenova EG, *et al.* Features of diagnosis and surgical treatment of intraductal neoplasms of the breast. UMJ 2019; **2** (1): 50–3 (in Ukrainian).  
4. Litvinenko OO, Tatskyi OF. Effective prevention of breast cancer recurrence: the role of exogenous peptides MHP in restoring immune homeostasis. J Klinichna immunohiia. Alerholohiia. Infektolohiia 2017; **3**: 50–7 (in Ukrainian).  
5. DeSantis CE, Miller KD, Goding Sauer A, *et al.* Cancer statistics for African Americans, 2019. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2019; **69** (3): 211–33.  
6. Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, *et al.* Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). Lancet Oncol 2008; **9** (8): 730–56.  
7. Taplin SH, Ichikawa L, Yood MU, *et al.* Reason for late-stage breast cancer: absence of screening or detection, or break-down in follow-up? JNCI 2004; **96** (20): 1518–27.  
8. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Breast cancer: a molecularly heterogeneous disease needing subtype-specific treatments. Medical sciences (Basel, Switzerland) 2020; **8** (1): 18 (<https://doi.org/10.3390/medsci8010018>).  
9. Laptiev SA, Korzhenevskaia MA, Imyanitov EN. Molecular-genetic «portrait» of breast cancer. The Scientific Notes of IPP-SPSMU 2017; **24** (2): 12–22 (in Russian).  
10. Jung M, Mertens C, Tomat E, *et al.* Iron as a central player and promising target in cancer progression. Int J Mol Sc 2019; **20** (2): 273.  
11. Chekhun VF, Yalovenko TN, Pavlova AA, *et al.* The clinical significance of the level of metal-containing proteins in the blood serum of patients with breast cancer. Oncological Journal (Republic of Belarus) 2016; **2** (38): 7–13.  
12. Torti SV, Torti FM. Iron: the cancer connection. Mol Asp Med 2020; **75**: 100860.  
13. Nakamura T, Naguro I, Ichijo H. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. BBA 2019; **1863** (9): 1398–1409.  
14. Muhoberac BB, Vidal R. Iron, ferritin, hereditary ferritinopathy, and neurodegeneration. Front Neurosci 2019; **13**: 1195.  
15. Gkouvatso K, Papanikolaou G, Pantopoulos K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. BB 2012; **1820** (3): 188–202.  
16. Hagag AA, Badraia IM, Abdelmageed MM, *et al.* Prognostic value of transferrin receptor-1 (CD71) expression in acute lymphoblastic leukemia. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2018; **18** (6): 610–17.  
17. Sabra S, Agwa MM. Lactoferrin, a unique molecule with diverse therapeutic and nanotechnological applications. Int J Biol Macromol 2020; **164**: 1046–60.  
18. Rodrigues L, Teixeira J, Schmitt F, *et al.* Lactoferrin and cancer disease prevention. Crit Rev Food Sci Nutr 2008; **49** (3): 203–17.  
19. Zhang Y, Lima CF, Rodrigues LR. Anticancer effects of lactoferrin: Underlying mechanisms and future trends in cancer therapy. Nutr Rev 2014; **72** (12): 763–73.  
20. Tsuda H, Kozu T, Iinuma G, *et al.* Cancer prevention by bovine lactoferrin: from animal studies to human trial. Biometals 2010; **23** (3): 399–409.  
21. Suzuki YA, Lönnerdal B. Baculovirus expression of mouse lactoferrin receptor and tissue distribution in the mouse. Biometals 2004; **17** (3): 301–9.  
22. Duarte DC, Nicolau A, Teixeira JA, *et al.* The effect of bovine milk lactoferrin on human breast cancer cell lines. J Dairy Sci 2011; **94** (1): 66–76.  
23. Guedes JP, Pereira CS, Rodrigues LR, *et al.* Bovine milk lactoferrin selectively kills highly metastatic prostate cancer PC-3 and osteosarcoma MG-63 cells in vitro. Front Oncol 2018; **8**: 200.  
24. Hu L, Gao CH, Hong C, *et al.* Expression, purification, and breast cancer cell inhibiting effect of recombinant human lactoferrin C-lobe. Biosci Biotechnol Biochem 2016; **80** (2): 257–63.

25. Hwang SM, Chung IY, Jo JH, *et al.* Comparison of proliferative effect of human lactoferrin and its proteolytic peptide on normal and transformed epithelial cells. *Biotechnol. Appl. Biochem* 2016; **178** (1): 44–57.
26. Sobin LH, Wittekind C. TNM. Classification of malignant tumors. Sixth Edition. UICC, Ed Willey-Liss 2003; p. 193.
27. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, *et al.* 4th. WHO Classification of Tumours of the Breast. Lyon: IARC Press; 2012.
28. Budwit-Novotny DA, McCarty KS, Cox EB, *et al.* Immunohistochemical analyses of estrogen receptor in endometrial adenocarcinoma using a monoclonal antibody. *Cancer Res* 1986; **46** (10): 5419–25.
29. Schulz DM, Böllner C, Thomas G, *et al.* Identification of differentially expressed proteins in triple-negative breast carcinomas using DIGE and mass spectrometry. *J Proteome Res* 2009; **8** (7): 3430–8.
30. Rossiello R, Carriero MV, Giordano GG. Distribution of ferritin, transferrin and lactoferrin in breast carcinoma tissue. *J Clin Path* 1984; **37** (1): 51–5.
31. Teng CT, Gladwell W, Beard C, *et al.* Lactoferrin gene expression is estrogen responsive in human and rhesus monkey endometrium. *Mol Human Reproduction* 2002; **8** (1): 58–67.
32. Ha NH, Nair VS, Reddy DNS, *et al.* Lactoferrin–endothelin-1 axis contributes to the development and invasiveness of triple-negative breast cancer phenotypes. *Cancer Res* 2011; **71** (23): 7259–69.

#### RELATION BETWEEN LACTOFERRIN LEVELS AND MOLECULAR BIOLOGICAL FEATURES OF BREAST MALIGNANT TUMORS

S.O. Sobchenko<sup>1</sup>, N.Yu. Lukianova<sup>2</sup>, V.M. Bazas<sup>1</sup>,  
T.V. Zadvorny<sup>2</sup>, O.M. Kliusov<sup>1</sup>, V.F. Chekhun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kyiv City Clinical Oncology Center

<sup>2</sup>R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology,  
Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine,  
Kyiv, Ukraine

**Summary. Aim:** to analyze the dependence of lactoferrin (LF) levels in serum and patient's tumor cells on the expression of molecular biomarkers in breast cancer (BC)

*cells and survival rates. Object and methods:* clinical samples of 151 patients with stage I–II BC were analyzed in the study; clinical, morphological, immunohistochemical, enzyme-linked immunosorbent assay and statistical methods were applied. **Results:** in BC patients, the heterogeneity of lactoferrin levels at the tumor and body level was demonstrated. It was determined that there is a statistically significant correlation between the lactoferrin level in blood serum and its expression in tumor cells with such molecular biological characteristics of BC as the expression of estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors ( $r = -0.53$  and  $r = -0.61$ , respectively), as well as tumor cells proliferative activity ( $r = 0.57$  and  $r = 0.49$ , respectively). The overall 5-year survival of BC patients was found out to be significantly shorter in patients with lactoferrin expression, lack of ER and PR expression and high proliferative potential of tumor cells. **Conclusions:** the obtained data deepened current knowledge about the association of disorders of iron-binding proteins metabolism in tumor cells and the patients' body with the malignancy degree of breast cancer; it points to the possibility of applying lactoferrin level in serum and tumor cells to integrated assessment and in-depth characterization of the malignant process in the breast.

**Key Words:** breast cancer, molecular biological features, lactoferrin.

**Адреса для листування:**

Задворний Т.В.

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

03022, Київ, вул. Васильківська, 45

E-mail: tito132007@ukr.net

Одержано: 17.06.2021