Н.П. Юрченко
І.П. Несіна
В.Ф. Чехун
Л.Г. Бучинська

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

Ключові слова: *рак молочної залози люмінального А підтипу, хемокін CXCL12, хемокіновий рецептор CXCR4, CD163$^+$-макрофаги.*

DOI: 10.32471/oncology.2663-7928.t-23-3-2021-g.9509

ЗНАЧЕННЯ ЕКСПРЕСІЇ ХОМІНГ-АСОЦІЙОВАНИХ БІЛКІВ У ПРОГРЕСІЇ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ ЛЮМІНАЛЬНОГО А ПІДТИПУ

Мета: *оцінити експресію хемокінового рецептора CXCR4, його ліганда — хемокіну CXCL12 у пухлинних клітинах і вміст CD163$^+$-макрофагів у стромальному мікрооточенні карцином молочної залози I–II стадії пухлинного процесу люмінального А підтипу.* ***Об'єкт і методи:*** *зразки операційного матеріалу 55 хворих на рак молочної залози (РМЗ) I–II стадії люмінального А молекулярного підтипу. Середній вік хворих становив 58,4 ± 2,1 роки. У роботі використовували клінічний, морфологічний, імуногістохімічний, статистичні методи дослідження.* ***Результати****: встановлено більш високу експресію CXCR4 і його ліганда у пухлинних клітинах молочної залози хворих люмінального А підтипу з I стадією (64,7 ± 6,2 та 66,6 ± 5,1% відповідно), ніж у пацієнток з II стадією пухлинного процесу (47,5 ± 6,1 та 36,7±6,4% відповідно, p < 0,05). Поряд з цим, у групі пацієнток з II стадією захворювання визначено відмінності за експресією досліджуваних маркерів у РМЗ за наявності і відсутності метастазів. Виявлено збільшення експресії CXCR4 (42,0 ± 10,2%), S18-2 (11,9 ± 1,7%) і зменшення CXCL12 (21,8 ± 7,6%) та вірогідно більшу кількість клітин, що експресують Ki-67 (23,1 ± 2,6%) у карциномах молочної залози хворих з метастазами порівняно з такими показниками у пухлинах пацієнтів з відсутністю метастазів (відповідно 33,9 ± 6,8 і 4,6 ± 0,8%; 54,3 ± 6,5% (p <0,05) та 15,8 ± 2,2% (p <0,05)). У стромальному компоненті карциноми молочної залози хворих із метастазами встановлено вірогідно більший вміст CD163$^+$-макрофагів (17,5 ± 6,6%) порівняно із цим показником у карциномах молочної залози хворих без метастатичного ураження (5,6 ± 1,2%, p<0,05). Проведене дослідження показало гетерогенність РМЗ у рамках одного молекулярного підтипу та однієї стадії захворювання за експресією хемокіну CXCL12, його рецептора CXCR4, мітохондріального білка S18-2 та вмісту такого імуносупресуючого фактора пухлинного мікрооточення, як макрофаги 2-го типу.* ***Висновки.*** *Встановлено, що більш низька експресія CXCL12, висока CXCR4, S18-2 та більший вміст CD163$^+$- макрофагів у карциномах молочної залози люмінального А підтипу пацієнток з II стадією захворювання асоціюється з такими ознаками агресивності пухлинного процесу, як ожиріння, високий проліферативний потенціал і наявність метастазів у лімфатичних вузлах. Отримані дані дозволять ідентифікувати більш злоякісні РМЗ люмінального А підтипу.*

Рак молочної залози (РМЗ), як і більшість злоякісних новоутворень, характеризується варіабільністю клінічного перебігу та чутливості до терапії, що значно ускладнює вибір тактики лікування хворих [1, 2]. Результати сучасних досліджень РМЗ показали, що така неоднорідність виникає внаслідок поліморфізму пухлин на молекулярному рівні. Визначення молекулярно-біологічних характеристик РМЗ сприяло розробці класифікації пухлин, в основу якої покладено експресію рецепторів стероїдних гормонів (естрогенів і прогестерону) та епідермального фактора росту 2-го типу (HER2/ErbB-2), що дозволило виділити основні підтипи карцином молочної залози — люмінальний А, люмінальний В, Her2-позитивний та базальний, що відрізняються між собою за прогнозом та відповіддю на протипухлинну терапію. Незважаючи на те, що РМЗ люмінального А підтипу характеризується відносно сприятливим перебігом захворювання, в рамках цього підтипу спостерігається значна молекулярна гетерогенність, що зумовлює різні ступені його злоякісності та клінічний перебіг [1, 3, 4]. У зв'язку з цим, продовжується активний пошук нових інформативних прогностичних маркерів цієї форми раку [1, 4]. Зокрема, значна увага приділяється вивченню сигнальних шляхів, ак-

тивація яких спричиняє підвищення агресивності пухлинного процесу.

Важливу роль у прогресії злоякісних новоутворень різного ґенезу, включаючи і РМЗ, відіграють хемокіни та їх рецептори, зокрема CXCL12 (Stromal Derived Factor-1 — SDF-1) та CXCR4 [5–10]. Встановлено, що взаємодія CXCR4 і CXCL12 індукує сигнальні шляхи — PI-3K/AKT, ERK1/2 та MAPK, що спричиняє міграцію пухлинних клітин, їх проліферацію, інгібування апоптозу та визначає інвазивний і метастатичний потенціал новоутворень [10–13]. Поряд із цим показано, що естрогени через свої рецептори сприяють експресії CXCL12 і CXCR4 [14]. У свою чергу, CXCL12, завдяки позитивному зворотному зв'язку, активують експресію естрогенових рецепторів (estrogen receptors — ER) [15]. Крім того CXCL12 бере участь у поляризації макрофагів 1-го типу у макрофаги 2-го типу (пухлиноасоційовані макрофаги, $CD163^+$-макрофаги); наслідком цього є зростання у пухлинному мікрооточенні вмісту імунних клітин з імуносупресивною функцією, що спричиняє прогресію пухлинного процесу [16]. На сьогодні доведено, що підвищений вміст $CD163^+$-макрофагів асоціюється з несприятливим прогнозом при різних нозологічних формах злоякісних новоутворень [17–18]. Визначено також зв'язок підвищеної кількості CXCL12-позитивних фібробластів пухлинного мікрооточення з агресивним перебігом РМЗ [19]. Крім того, встановлено, що одним з індукторів експресії CXCR4 є мітохондріальний рибосомний білок S18-2, висока експресія якого корелює з агресивними типами раку передміхурової, молочної залоз і ендометрію [20–22]. Водночас на сьогодні ще малодослідженим залишається питання асоціації розглянутих вище молекулярних ознак (CXCR4, CXCL12, S18-2) пухлинних клітин та особливостей пухлинного мікрооточення (вміст $CD163^+$-макрофагів) з агресивністю перебігу РМЗ люмінального А підтипу (клінічна стадія, наявність метастазів у лімфатичних вузлах).

З огляду на зазначене, мета дослідження полягала в оцінці експресії хемокінового рецептора CXCR4, його ліганда — хемокіну CXCL12 у пухлинних клітинах і вміст $CD163^+$-макрофагів у стромальному мікрооточенні карцином молочної залози I–II стадії пухлинного процесу люмінального А підтипу.

ОБ'ЄКТ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У дослідженнях використано операційний матеріал 55 хворих на РМЗ I–II стадії, які проходили лікування у Київському міському клінічному онкологічному центрі та дали інформовану згоду на використання їх даних та біологічного матеріалу в дослідницьких цілях. Жодна з пацієнток не отримувала спеціального лікування до оперативного втручання. Середній вік хворих становив 58,4 ± 2,1 року. РМЗ I стадії було діагностовано у 21 жінки, II стадії — у 34 (без метастазів у лімфатичних вузлах — 19, з метастазами — 15).

Експресію маркерів визначали імуногістохімічним методом із використанням відповідних первинних моноклональних антитіл до хемокіну CXCL12 (клон 79018, Thermo Fisher Scientific, USA) і маркера проліферації Ki-67 (клон MIB-1, DakoCytomation, Denmark) та поліклональних антитіл до S18-2 (Proteintechgroup, USA) і CXCR4 (Thermo Fisher Scientific, USA). Виявлення пухлиноасоційованих макрофагів проведено з використанням моноклональних антитіл до CD163 (клон Mob460-05, Diagnostic BioSystems, USA). Для детекції зазначених білків використовували систему візуалізації PolyVue HRP/DAB Detection System (Diagnostic BioSystems, USA) та субстрат-хромоген 3-діамінобензидин тетрахлорид. Ядра клітин забарвлювали гематоксиліном Майєра.

Експресію маркерів оцінювали шляхом підрахунку кількості позитивно забарвлених клітин, визначених у відсотках — індекс мітки (ІМ). У кожному випадку аналізували 800–1000 пухлинних клітин. Кількість позитивно забарвлених $CD163^+$-макрофагів визначали за кількістю клітин на одне поле зору (кл/пз) мікроскопу, аналізуючи їх у 10 полях зору при збільшенні ×400.

При значеннях експресії CXCL12, CXCR4 менших за медіану (Me) експресію відповідного маркера вважали низькою, а при значеннях, вищих за Me — високою.

Ступінь ожиріння визначали на основі даних про зріст і масу тіла жінок шляхом розрахунку індексу маси тіла (ІМТ, індекс Кетле) за формулою: m/h ($м^2$), де m — маса тіла, кг; h — зріст, м. При значеннях ІМТ $\geqslant$30 кг/$м^2$ вважали, що у обстежених осіб спостерігається ожиріння.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою пакету програм Statistica 7.0 (StatSoft, Inc.) з використанням непараметричного U-критерію Манна — Уітні (Mann — Whitney U Test), кореляційного аналізу (ρ — коефіцієнт рангової кореляції Спірмена). Достовірними вважали розбіжності при $p<0,05$.

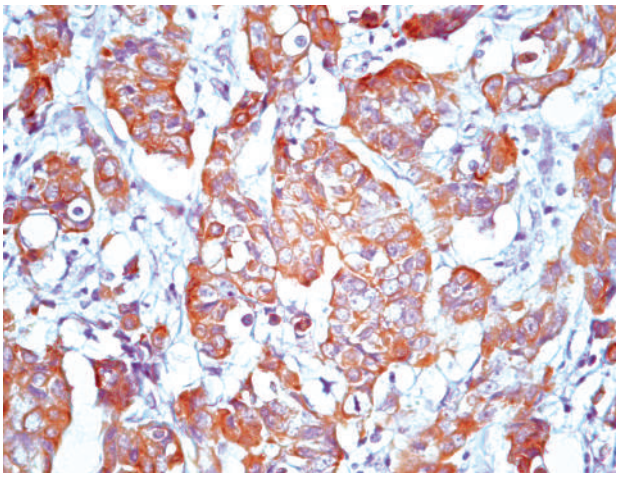
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

На основі аналізу антропометричних показників хворих на РМЗ виявлено, що 66,7% пацієнток мали ІМТ <30 кг/$м^2$, а у 33,3% цей показник був >30 кг/$м^2$, що відповідало ожирінню. При цьому ожиріння спостерігали у 36,4% пацієнток з I стадією і у 63,6% хворих з II стадією захворювання. Шляхом аналізу клінічних даних встановлено, що у 38,8% хворих з II стадією виявлено метастази РМЗ у регіонарні лімфатичні вузли.

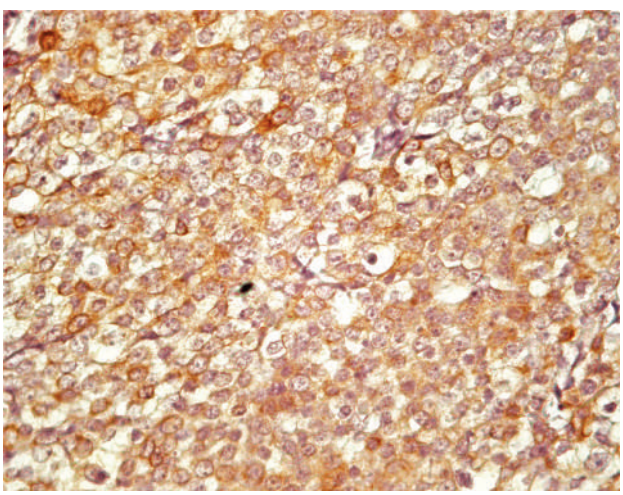
Результати морфологічного дослідження показали, що пухлини молочної залози люмінального А підтипу мали будову протокової карциноми у 71,4%, дольковой — у 28,6% випадків.

Результати імуногістохімічного дослідження показали, що позитивна експресія хемокіну CXCL12 спостерігалася у 90,3% випадків, його ре-

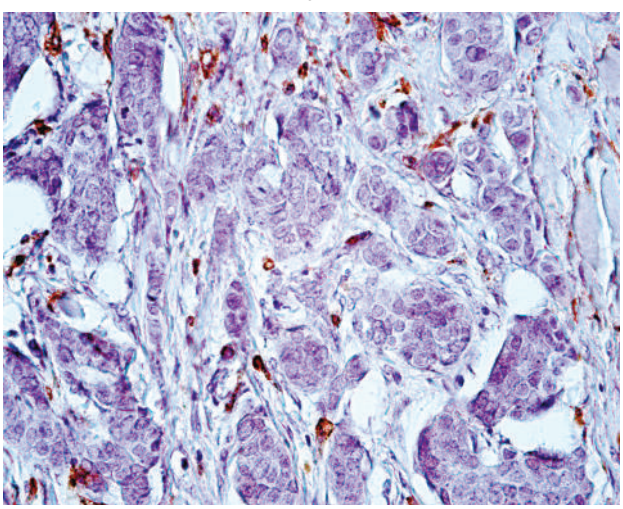
цептора CXCR4, а також CD163$^+$-макрофаги — в усіх досліджених пухлинних зразках молочної залози (рис. 1). Середні значення експресії CXCL12 становили 46,8 ± 5,0%, його рецептора — 39,2 ± 5,7%. Me експресії CXCL12 — 56,3%, CXCR4 — 31,5%.



а



б



в

Рис. 1. Детекція експресії хемокіну CXCL12 (*а*, зб. ×400), хемокінового рецептора CXCR4 (*б*, зб. ×400) і CD163$^+$-макрофагів (*в*, зб. ×200) у клітинах карцином молочної залози

Вміст CD163$^+$-макрофагів у пухлинному мікрооточенні молочної залози становив 9,9 ± 2,6 кл/пз при Me 6,0 кл/пз. При цьому більшість (64,5%) пухлинних клітин молочної залози мали високу (>Me) експресію хемокіну CXCL12, а високу експресію його рецептора CXCR4 виявляли у 33,3% клітин.

Дослідження експресії хемокіну і його рецептора показало більш високу експресію CXCR4 і його ліганда у пухлинах РМЗ хворих з I стадією порівняно з пацієнтками з II стадією захворювання (таблиця). Крім того, у карциномах хворих з II стадією пухлинного процесу спостерігалася майже у 4 рази більша кількість CD163$^+$-макрофагів порівняно з такою при РМЗ I стадії.

Таблиця

Експресія біомолекулярних маркерів у РМЗ люмінального А підтипу з різною стадією захворювання

Клініч-ний по-казник	Досліджені показники			
	CXCL12, ІМ, %	CXCR4, ІМ, %	CD163$^+$-макрофаги, кл/пз	Маркер проліферації Ki-67
I стадія	66,6 ± 5,1	64,7 ± 6,2	3,4 ± 0,4	17,0 ± 1,3
II стадія	36,7 ± 6,4*	47,5 ± 6,1	12,1 ± 3,4*	20,0 ± 1,5

Примітка:* p <0,05 порівняно з I стадією пухлинного процесу.

Експресія маркера проліферуючих клітин Ki-67 у карциномах молочної залози I і II стадій майже не відрізнялася (див. таблицю). Натомість у пацієнток з II стадією захворювання спостерігали відмінності проліферативного потенціалу залежно від наявності або відсутності метастазів. Так, виявлено вірогідно більшу кількість клітин, що експресували Ki-67, у карциномах молочної залози хворих з метастазами порівняно з аналогічним показником у пухлинах пацієнток за відсутності метастазів (рис. 2*а*). Крім того, у РМЗ хворих з метастазами визначено зростання експресії CXCR4, зменшення — CXCL12, а також спостерігався більш високий вміст CD163$^+$-макрофагів, ніж у карциномах осіб без метастазів (рис. 2*б–г*).

Треба зазначити, що у пухлинах хворих з метастазами експресія S18-2 становила 11,9 ± 1,7%, що у 2,5 рази перевищувало таку в новоутвореннях осіб без метастазів (4,6 ± 0,8%, p <0,05) (рис. 3).

Важливо відмітити, що особливості експресії досліджених молекулярних маркерів у РМЗ люмінального А підтипу II стадії за наявності метастазів (порівняно з РМЗ II стадії без метастазів вміст CXCR4, Ki-67, S18-2 — підвищений, CXCL12 — зменшений) подібні до таких у РМЗ базального молекулярного підтипу, який за клініко-патологічними і молекулярними ознаками характеризується високим ступенем злоякісності. Так, у РМЗ базального підтипу експресія CXCR4 і CXCL12 становила 41,5 ± 10,9 і 17,4 ± 7,0% відповідно. У таких пухлинах було визначено також значний кореляційний зв'язок (ρ = 0,6, p <0,05) між експресією S18-2 і Ki-67 [22].

Крім того, було визначено відмінності експресії досліджуваних маркерів у карциномах молочної залози люмінального А підтипу залежно від наявності

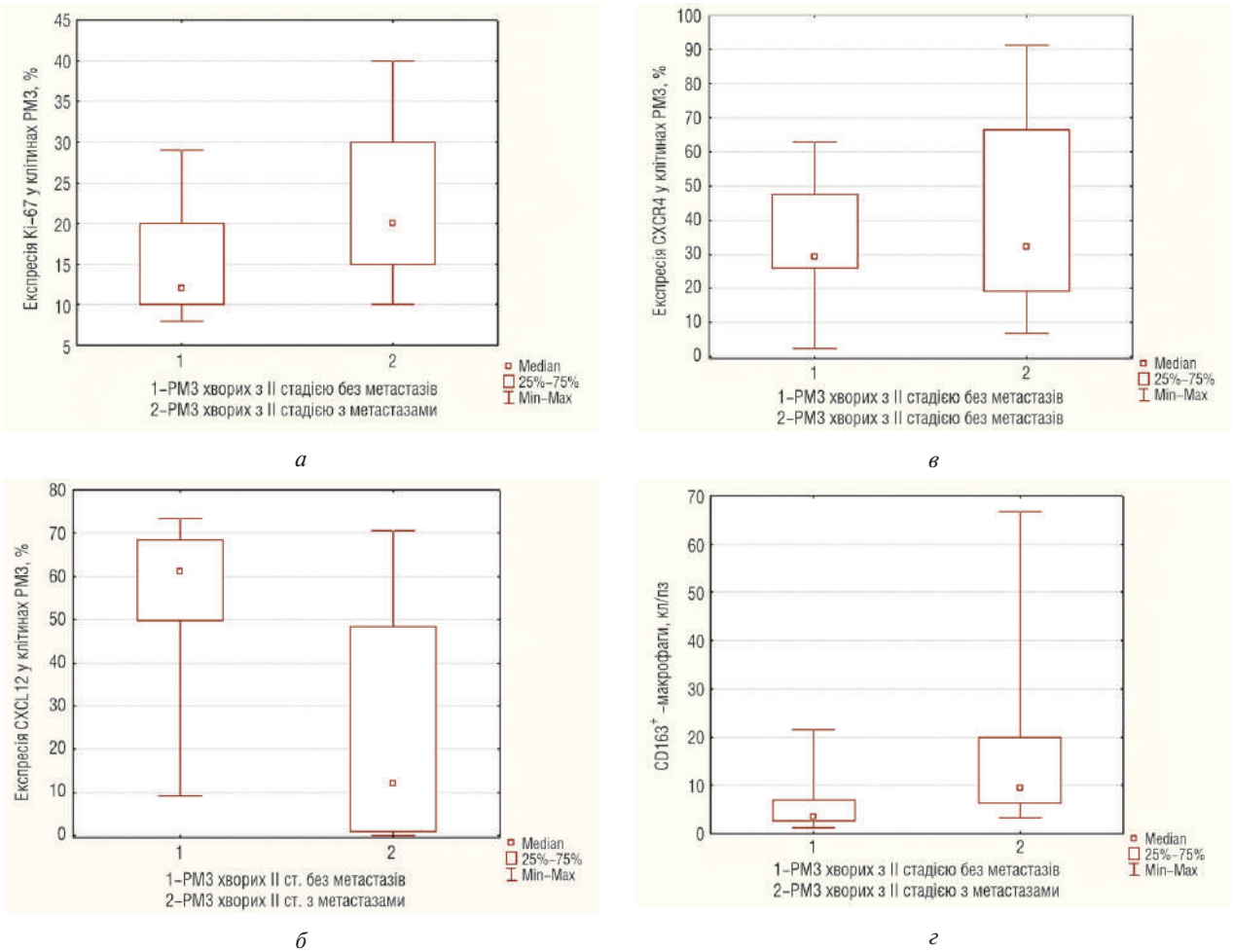


Рис. 2. Особливості експресії Ki-67 (*а*), CXCL12 (*б*), CXCR4 (*в*) в пухлинних клітинах та вміст CD163$^+$-макрофагів в стромальному мікрооточенні (*г*) РМЗ II стадії люмінального А підтипу залежно від наявності метастазів

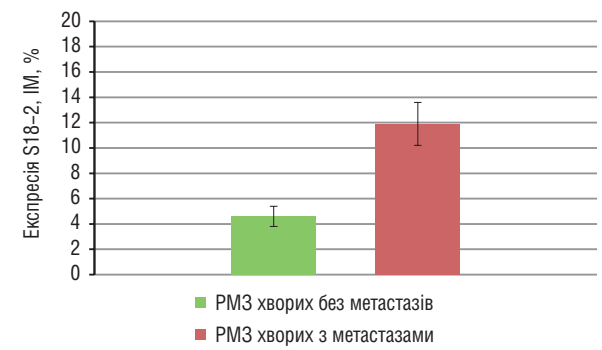


Рис. 3. Експресія S18-2 у РМЗ II стадії люмінального А молекулярного підтипу залежно від наявності метастазів

у хворих ожиріння. Встановлено, що у пухлинах хворих без ожиріння спостерігалася підвищена експресія CXCL12 (42,4 ± 6,6%) і знижена експресія його рецептора CXCR4 (48,7 ± 2,4%) порівняно з карциномами хворих з ожирінням (31,9 ± 8,6% і 55,8 ± 2,9% відповідно). Поряд із цим визначено, що кількість CD163$^+$-макрофагів у карциномах молочної залози хворих з ожирінням була майже у 3 рази більшою (17,0 ± 6,7 кл/пз), ніж у пухлинах пацієнтів без ожиріння (5,7 ± 0,8 кл/пз, p <0,05). Слід зазначити, що у хворих з метастазами у 56,0% випадків спостерігалося ожиріння, і пухлини цих пацієнтів характеризувалися низькою експресію CXCL12 (13,9 ± 10,0%), високою експресією CXCR4 (51,6 ± 2,8%) і значним збільшенням кількості CD163$^+$-макрофагів (31,9 ± 9,6%).

Отже, згідно з результатами представленого дослідження, більш високий рівень експресії CXCL12 і CXCR4 у пухлинних клітинах РМЗ люмінального А підтипу був притаманний пухлинам хворих з I стадією захворювання. Клітини РМЗ II стадії характеризувалися варіабельністю експресії згаданих маркерів залежно від наявності метастазів у периферичних лімфатичних вузлах. Так, у РМЗ II стадії з метастазами встановлено вірогідно меншу експресію хемокіну CXCL12, більшу CXCR4 та зростання кількості такого компоненту пухлинного мікрооточення, як CD163$^+$-макрофаги, що асоціювалося з високим проліферативним потенціалом порівняно з карциномами без метастазів.

Висока експресія CXCL12 і CXCR4, що визначалася у пухлинних клітинах молочної залози хворих з I стадією захворювання, може бути зумовлена впливом ER, висока експресія яких характерна для РМЗ люмінального А підтипу. Зниження експресії CXCL12, що спостерігалося в клітинах РМЗ хворих з II стадією, може бути результатом гіперме-

тилування його промотора або інгібуючого впливу регулятора його експресії — мікроРНК-31 [23, 24].

Виявлене нами збільшення експресії CXCR4 у РМЗ хворих з метастазами і осіб з ожирінням може виникати внаслідок високої експресії S18-2, яка корелює з прогресуванням карцином молочної залози люмінального А і базального підтипів [21]. Поряд із цим показано, що секреція CXCL12 пухлиноасоційованими фібробластами, збільшуючись, спричиняє підвищення експресії CXCR4 [25].

Зростання експресії CXCR4 у хворих з ожирінням може бути зумовлено збільшенням вмісту лептину в сироватці периферичної крові, який активує ряд транскрипційних факторів. Нашими дослідженнями було визначено, що у хворих на РМЗ ознаки агресивності пухлинного процесу (базальний молекулярний підтип, низький ступінь диференціювання і високий проліферативний потенціал новоутворення) асоціюються з ожирінням і зростанням концентрації лептину в сироватці периферичної крові [26].

Не виключено, що асоційований з ожирінням підвищений рівень естрогенів індукує експресію CXCL12 і CXCR4 та високий вміст CD163$^+$-макрофагів у карциномах і може модулювати перебіг пухлинного процесу. Іншими дослідниками було виявлено, що активація CXCL12/CXCR4-шляху та підвищення вмісту CD163$^+$-макрофагів асоціюється з агресивним перебігом захворювання у хворих на РМЗ люмінального В підтипу. [27]. Слід зазначити, що при експресії епітеліальними пухлинними клітинами хемокіну CXCL12 він може аутокринно регулювати експресію свого рецептора CXCR4, що корелює з меншим потенціалом злоякісності новоутворення. Так, за результатами ряду досліджень показано, що пухлинні клітини колоректального раку, молочної залози, ендометрію, які експресують високий/низький рівень CXCR4 і високий CXCL12 асоціюються з більш сприятливим прогнозом перебігу захворювання. На противагу зазначеному пухлинні клітини з високою експресію CXCR4 і низькою його ліганда мігрують в тканини з високим рівнем експресії CXCL12, що корелює з агресивністю пухлинного процесу [6–9, 28, 29].

У той же час встановлено, що збільшення кількості CXCL12$^+$-пухлиноасоційованих фібробластів корелює з виникненням метастазів у хворих зі злоякісними пухлинами молочної і передміхурової залози, ендометрію, легені, товстої кишки, яєчника, меланоми [30–34]. Тобто, експресія CXCL12 може по-різному впливати на перебіг пухлинного процесу залежно від того, де він експресується — у стромальних фібробластах чи в пухлинних клітинах.

Таким чином, проведене дослідження показало гетерогенність РМЗ у рамках молекулярного А підтипу за експресією хемокіну CXCL12, його рецептора CXCR4, білка S18-2 та вмісту CD163$^+$-макрофагів. Встановлено, що більш низька експресія CXCL12 і висока CXCR4 та збільшення кількості CD163$^+$-макрофагів у карциномах молочної залози люмінального А підтипу пацієнток з II стадією захворювання асоціюється з такою ознакою агресивності пухлинного процесу, як високий проліферативний потенціал, наявність у хворих метастазів у лімфатичних вузлах та такої ознаки метаболічного синдрому, як ожиріння.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено міжпухлинну гетерогенність за експресією хемокіну CXCL12, його рецептора CXCR4, білка S18-2 у пухлинних клітинах, а також за кількістю CD163$^+$-макрофагів у стромальному мікрооточенні в рамках однієї форми раку — карциноми молочної залози люмінального А підтипу.

2. Показано, що у хворих із ожирінням пухлинні клітини характеризуються зниженою експресією CXCL12, високою — CXCR4 та підвищеним вмістом CD163$^+$-макрофагів, що може свідчити про негативний вплив цієї ознаки метаболічного синдрому на перебіг пухлинного процесу у хворих на РМЗ.

3. Виявлено, що наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах хворих на РМЗ II стадії люмінального А підтипу асоціюється з низькою експресією хемокіну CXCL12, високою — його рецептора CXCR4 і білка S18-2 у пухлинних клітинах та підвищеним вмістом CD163$^+$-макрофагів у пухлинному мікрооточенні. Досліджені маркери можуть бути використані для оцінки агресивності пухлинного процесу в молочній залозі.

Робота виконувалася в рамках НДР «Молекулярно-біологічні фактори гетерогенності злоякісних клітин та варіабельність клінічного перебігу гормонозалежних пухлин» (0117U002034) за фінансової підтримки Цільової програми наукових досліджень Відділення біохімії, фізіології і молекулярної біології Національної академії наук України «Молекулярно-генетичні і біохімічні механізми регуляції клітинних та системних взаємодій за фізіологічних та патологічних станів» (2017–2021).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Poudel P, Nyamundanda G, Patil Y, *et al.*** Heterocellular gene signatures reveal luminal-A breast cancer heterogeneity and differential therapeutic responses. NPJ Breast Cancer. 2019; **5**: 21. DOI: 10.1038/s41523-019-0116-8.

2. **Fragomeni SM, Sciallis A, Jeruss JS**. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. Surg Oncol Clin N Am 2018; **27**(1): 95–120. DOI: 10.1016/j.soc.2017.08.005.

3. **Ciriello G, Sinha R, Hoadley KA**, ***et al.*** The molecular diversity of luminal A breast tumors. Breast Cancer Res Treat 2013; **141** (3): 409–20. DOI: 10.1007/s10549-013-2699-35.

4. **Netanely D, Avraham A, Ben-Baruch A, *et al.*** Expression and methylation patterns partition luminal-A breast tumors into distinct prognostic subgroups. Breast Cancer Res 2016; **18:** 74. DOI: 10.1186/s13058-016-0724-2.

5. **Janssens R, Struyf S, Proost P.** Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. Cytokine Growth Factor Rev 2018; **44:** 51–68. DOI:10.1016/j.cytogfr.2018.10.004.

6. **Samarendra H, Jones K, Petrinic T, *et al.*** A meta-analysis of CXCL12 expression for cancer prognosis. Br J Cancer 2017; **117:** 124–35. DOI: 10.1038/bjc.2017.134.

7. **Zhao H, Guo L, Zhao H. *et al.*** CXCR4 over-expression and survival in cancer: a system review and meta-analysis. Oncotarget 2015; **6:** 5022–40.

8. **Mukherjee D, Zhao J.** The role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. Am J Cancer Res 2013; **3:** 46–57.

9. **Buchynska LG, Movchan OM, Iurchenko NP.** Expression of chemokine receptor CXCR4 in tumor cells and content of CXCL12+-fibroblasts in endometrioid carcinoma of endometrium. Exp Oncol 2021; **43** (2): 135–41. doi: 10.32471/exp-oncology.2312-8852.vol-43-no-2.16240.

10. **Zielińska KA, Katanaev VL.** The signaling duo CXCL12 and CXCR4: chemokine fuel for breast cancer tumorigenesis. Cancers (Basel) 2020; **12** (10): 3071. DOI: 10.3390/cancers12103071.

11. **Shi Yi, Riese DJ, Shen J.** The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 chemokine axis in cancer. Front Pharmacol 2020; **11**: 574667. DOI: 10.3389/fphar.2020.574667.

12. **Meng W, Xue S, Chen Y.** The role of CXCL12 in tumor microenvironment. Gene 2018. DOI:10.1016/j.gene.2017.10.015.

13. **Liu W, Yang Z, Lu W, *et al.*** Chemokines and chemokine receptors: A new strategy for breast cancer therapy. Cancer Med 2020; **9 (**11): 3786–99. DOI: 10.1002/cam4.3014.

14. **Kobayashi T, Tsuda H, Moriya T, *et al.*** Expression pattern of stromal cell-derived factor-1 chemokine in invasive breast cancer is correlated with estrogen receptor status and patient prognosis. Breast Cancer Res Treat 2010; **123** (3): 733–45.

15. **Felix A, Stone R, Chivukula M, *et al.*** Survival outcomes in endometrial cancer patients are associated with CXCL12 and estrogen receptor expression. Int J Cancer 2013. DOI: 10.1002/ijc.27317.

16. **Ghoneum A, Afify H, Salih Z, *et al.*** Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. **Oncotarget 2018; 9 (32): 22832–49.**

17. **Sahoo SS, Zhang XD, Hondermarck H, Tanwar PS.** The emerging role of the microenvironment in endometrial cancer. Cancers 2018; **10**: 408; DOI:10.3390/cancers10110408.

18. **Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, *et al.*** Distribution of M1 and M2 macrophages in tumor islets and stroma in relation to prognosis of non-small cell lung cancer. BMC Immunology 2018; **19**: 3. DOI 10.1186/s12865-018-0241-4.

19. **Ahirwar DK, Nasser MW, Ouseph MM, *et al.*** Fibroblast-derived CXCL12 promotes breast cancer metastasis by facilitating tumor cell intravasation. Oncogene 2018; **37**, 4428–42. DOI: 10.1038/s41388-018-0263-7.

20. **Mushtaq M, Jensen L, Davidsson S, *et al.*** The MRPS18-2 protein levels correlate with prostate tumor progression and it induces CXCR4-dependent migration of cancer cells. Sci Rep 2018; **8:** 2268

21. **Mints M, Mushtaq M, Iurchenko N, *et al.*** Mitochondrial ribosomal protein S18-2 is highly expressed in endometrial cancers along with free E2F1. Oncotarget 2016; **7** (16): 22150–8. DOI: 10.18632/oncotarget.7905.

22. **Buchynska LG, Iurchenko NP, Kashuba EV, *et al.*** Overexpression of the mitochondrial ribosomal protein S18-2 in the invasive breast carcinomas Exp Oncol 2018; **40** (4): 303–8.

23. **Wendt MK, Johanesen PA, Kang-Decker N, *et al.*** Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. Oncogene 2006; **25** (36): 4986–97.

24. **Chattopadhyay E, Singh R, Ray A, *et al.*** Expression deregulation of mir31 and CXCL12 in two types of oral precancers and cancer: importance in progression of precancer and cancer. Sci Rep 2016; **6**: 32735. DOI: 10.1038/srep32735

25. **Yao L, Heuser-Baker J, Barlic-Dicen J.** Chemokine receptors on the defensive — the surprising role of CXCR4 in brown adipose tissue. Recept Clin Invest 2015; **2:** e397. DOI: 10.14800/rci.397.

26. **Nesina IP, Zadvorny TV, Nespryadko SV, *et al.*** Contents of adiponectin and leptin in peripheral blood serum of brest and endometrial cancer patients with obesity. Oncology 2019; **21** (1): 17–22 (In Ukrainian).

27. **Raschioni C, Bottai G, Sagona A. *et al.*** CXCR4/CXCL12 signaling and protumor macrophages in primary tumors and sentinel lymph nodes are involved in luminal B breast cancer progression. Dis Markers 2018: 5018671. DOI: 10.1155/2018/5018671.

28. **Sun Q, Zhou H, Binmadi NO, Basile JR.** Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity. J Biol Chem 2009; **284:** 32066–074.

29. **Janssens R, Struyf S, Proost P.** The unique structural and functional features of CXCL12. Cell Mol Immunol 2018; **15**(4): 299–311 DOI: 10.1038/cmi.2017.107.

30. **Teng F, Tian WY, Wang YM, *et al.*** Cancer-associated fibroblasts promote the progression of endometrial cancer via the SDF-1/CXCR4 axis. J Hematol Oncol 2016; **9**: 8. DOI: 10.1186/s13045-015-0231-4.

31. **Zavyalova MV, Denisov EV, Tashireva LA, *et al.*** Intravasation as a key step in cancer metastasis. Biochemistry. 2019; **84**(7): 972–84 (in Russian).

32. **Wu W, Qian L, Chen X *et al.*** Prognostic significance of CXCL12, CXCR4, and CXCR7 in patients with breast cancer. J Clin Exp Pathol 2015; **8** (10): 13217–24.

33. **Kircher M. Herhaus P, Schottelius M. *et al.*** CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. Ann Nucl Med 2018; **32** (8): 503–51. DOI: 10.1007/s12149-018-1290-8.

34. **Joshi RS, Kanugula SS, Sudhir S. *et al.*** The role of cancer-associated fibroblasts in tumor progression. Cancers 2021; **13** (6): 1399. DOI: 10.3390/cancers13061399.

THE SIGNIFICANCE OF HOMING-ASSOCIATED PROTEIN EXPRESSION IN PROGRESSION OF LUMINAL SUBTYPE A BREAST CANCER

N.P. Iurchenko, I.P. Nesina, V.F. Chekhun, L.G. Buchynska

R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. ***Aim:*** *to evaluate the expression of chemokine receptor CXCR4, its ligand — chemokine CXCL12, — mitochondrial ribosomal protein S18-2 and Ki-67 protein in tumor cells as well as the content of CD163$^+$-macrophages in the stromal microenvironment of luminal A breast carcinomas of stage I-II.* **Object and methods:** *surgical samples of 55 patients with luminal A breast cancer (BC) of stage I-II. The average age of patients was 58.4 ± 2.1 years. The study used clinical, morphological, immunohistochemical (IHC) and statistical methods.* **Results:** *In patients with luminal A BC, higher expression of CXCR4 and its ligand (64.7 ± 6.2 and 66.6 ± 5.1% respectively) was found in tumor cells of patients with stage I than in patients with stage II tumor process (47.5 ± 6.1 and 36.7 ± 6.4%, p <0.05, respectively). In addition, there were determined the differences in the expression of the studied markers in the group of patients with stage II BC depending on the presence or absence of metastases. An increase in the expression of CXCR4 (42.0 ± 10.2%), S18-2 (11.9 ± 1.7%), a decrease of CXCL12 (21.8 ± 7.6%) and the significantly greater number of cells expressing Ki-67 (23.1 ± 2.6%) were found in breast carcinomas of pa-*

tients with metastases compared to those of patients with no metastases (respectively 33.9 ± 6.8 and 4.6 ± 0.8%; 54.3 ± 6.5%, (p <0.05) and 15.8 ± 2.2%,(p <0.05)). In the stromal component of breast carcinomas in patients with metastases a significantly higher content of CD163$^+$-macrophages (17.5 ± 6.6%) was found compared to breast carcinomas of patients without metastatic lesions (5.6 ± 1.2%, p <0.05). The study demonstrated the heterogeneity of breast cancer in the expression of chemokine CXCL12, its receptor CXCR4, and the content of such immunosuppressive cells of the tumor environment as macrophages type 2 within one molecular subtype and one stage of the disease. **Conclusions:** *in luminal A breast cancer, the intertumor heterogeneity of the expression of chemokine CXCL12, its receptor CXCR4, protein S18-2 in tumor cells, as well as of the content of CD163$^+$-macrophages in the stromal microenvironment was shown. It was found that the lower expression of CXCL12, high CXCR4 and S18-2 in tumor cells together with the higher content of CD163$^+$-macrophages in stromal microenvironment is associated with such signs of the tumor process aggressiveness as high proliferative potential, metastases in the lymph nodes and the obesity. The obtained data allow identifying more malignant breast cancer of luminal A subtype.*

Key Words: luminal A breast cancer, chemokine CXCL12, chemokine receptor CXCR4, CD163$^+$-macrophages.

Адреса для листування:
Юрченко Н.П.
03022, Київ, вул. Васильківська, 45
Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України
E-mail: laboncogen@gmail.com

Одержано: 24.09.2021