

Міністерство охорони здоров'я України
Національна академія наук України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи

**МЕТАЛОВМІСНІ БІЛКИ ЯК МАРКЕРИ МОНІТОРИНГУ
ПЕРЕБІГУ ТА ЕФЕКТИВНОСТІ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНОГО
ЛІКУВАННЯ ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

(методичні рекомендації)

Київ-2016

Міністерство охорони здоров'я України
Національна академія наук України
Український центр наукової медичної інформації
та патентно-ліцензійної роботи

„УЗГОДЖЕНО”

В.о. директора Медичного
департаменту МОЗ України



А.О. Гаврилюк

2016 р.

**МЕТАЛОВМІСНІ БІЛКИ ЯК МАРКЕРИ МОНІТОРИНГУ ПЕРЕБІГУ
ТА ЕФЕКТИВНОСТІ ХІМОТЕРАПЕВТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ
ХВОРИХ НА РАК МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

(методичні рекомендації)

Київ - 2016

Установи-розробники:

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології

ім. Р.С.Кавецького НАН України

Національний інститут раку МОЗ України

Київський міський клінічний онкологічний центр

Укладачі:

д. мед. н., професор, академік НАНУ Чехун В. Ф. (044) 259-01-83

д. біол. н. Лук'янова Н. Ю. (044) 257-96-44

Клюсов О. М. (044) 424-68-18

Собченко С. О. (044) 450-75-68

к. мед. н. Чехун С. В. (044) 257-96-44

Павлова А. О. (044) 257-96-44

Яловенко Т. М. (044) 257-96-44

д. мед. н., професор Смоланка І. І. (044) 257-93-15

Рецензент: головний позаштатний спеціаліст зі спеціальності «Онкологія»

МОЗ України д. мед. н., професор О.О. Ковальов

ЗМІСТ

	стор.
Перелік умовних скорочень.....	4
Вступ.....	5
Обґрунтування необхідності використання металовмісних протеїнів для прогнозування перебігу раку молочної залози.....	8
1. Визначення рівня металовмісних білків у хворих на РМЗ з використанням імуноферментного методу.....	12
1.1. Опис методики.....	13
2. Дизайн дослідження.....	15
2.1. Клінічна характеристика хворих.....	15
3. Зв'язок рівнів металовмісних білків у сироватці крові хворих з клініко-морфологічними показниками РМЗ.....	17
4. Визначення зв'язків рівнів гепсидину та феритину в сироватці крові хворих на РМЗ з чутливістю до неоад'ювантної хіміотерапії.....	21
Практичні рекомендації.....	24
Висновки.....	25
Перелік рекомендованої літератури.....	26

Перелік умовних скорочень

- ІФА — імуноферментний аналіз
- НХТ — неoad'ювантна хіміотерапія
- РМЗ — рак молочної залози
- ПХТ — поліхіміотерапія
- ТФ — трансферин
- ФЕР — феритин
- ЦП — церулоплазмін

ВСТУП

Рак молочної залози (РМЗ) (код за МКХ-10: C50), залишається однією з найпоширеніших форм онкологічної патології в багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні. За даними ВООЗ щорічно у світі виявляють 1,38 млн. нових випадків раку даної локалізації. Показники захворюваності і смертності хворих на РМЗ в Україні залишаються високими, відповідно 62,3 і 26,3 на 100 тис. жіночого населення. У статеві-віковій структурі онкологічних захворювань населення України РМЗ за питомою вагою займає перше місце у жінок віком 30-74 роки.

З числа вперше захворілих на РМЗ не проживають одного року 10,9 % хворих, на момент встановлення діагнозу у 25 % хворих реєструють місцево поширені форми РМЗ. Вдосконалення підходів до лікування РМЗ залишається однією з актуальних проблем онкології у зв'язку з високим рівнем захворюваності та зростанням кількості пацієнток з резистентними до неoad'ювантної хіміотерапії (НХТ) формами, що обумовлює необхідність подальших досліджень біологічних аспектів даної онкологічної патології.

Проблема своєчасного виявлення та моніторингу перебігу РМЗ полягає не лише в його безсимптомному розвитку, а й у відсутності надійних маркерів для прогнозування перебігу захворювання та чутливості до медикаментозного лікування. На сьогодні виділяють декілька типів онкомаркерів – метаболомні, протеомні, генетичні, епігенетичні, імуногістохімічні та біохімічні.

В рутинній практиці найбільш поширені імуногістохімічні маркери. Основним недоліком останніх є їх одноразове визначення в клітинах видаленої пухлини, що, в свою чергу, не дозволяє проводити подальший моніторинг перебігу пухлинної хвороби та оцінювати ефективність

проведеного лікування.

Сучасним трендом у лікуванні РМЗ є розробка прогностичних процедур, орієнтованих на малоінвазивність, насамперед, проведення досліджень в біологічних рідинах, і в першу чергу, циркулюючій крові. Такий підхід не потребує матеріалу, отриманого безпосередньо з пухлинної тканини, а, отже, не залежить від локалізації новоутворення, дозволяє виявляти як первинні пухлини, так і вторинні вогнища.

Співробітники Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України (ІЕПОР) протягом багатьох років займаються розробкою підходів щодо використання маркерів для індивідуалізованого лікування хворих на РМЗ. Багаторічними експериментальними та клінічними дослідженнями переконливо доведено наявність взаємозв'язку між фенотипом клітин РМЗ та нормальними тканинами організму, що відкриває можливості для використання позапухлинних маркерів (визначаються в сироватці крові), вкрай необхідних для пошуку нових шляхів прогнозування ефективності медикаментозної терапії і перебігу хвороби.

Застосування запропонованого комплексу позапухлинних маркерів у вигляді металовмісних білків сприятиме значному поліпшенню якості та подовженню життя хворих завдяки покращанню ефективності індивідуалізованого лікування.

Методичні рекомендації підготовлено за результатами наукових досліджень: "Молекулярна епідеміологія металовмісних білків у взаємовідносинах пухлини та організму" (2012-2016 рр., № державної реєстрації 0112U002197) та "Роль металовмісних протеїнів у пухлинному рості і можливості їх використання в якості позапухлинних маркерів чутливості до протипухлинних препаратів" (2013-2015 рр., № державної

реєстрації 0112U004721). Отримані результати стали підставою для підготовки методичних рекомендацій.

Так, в експериментах *in vivo* встановлено, що ріст та розвиток чутливої та резистентної карциноми Герена супроводжується суттєвими змінами спектру металовмісних протеїнів та окремих факторів їх епігенетичної регуляції у сироватці крові та пухлинній тканині тварин.

Ex vivo на клінічному матеріалі хворих на РМЗ підтверджена участь металовмісних білків у формуванні ступеня злоякісності та чутливості до протипухлинних препаратів, а також ідентифіковані металовмісні білки – феритин, трансферин, церуплазмін і гепсидин, що можуть бути використані в якості позапухлинних маркерів чутливості до цитостатиків та моніторингу ефективності протипухлинного лікування.

Методичні рекомендації із зазначеним спектром металовмісних білків, запропонованих в якості маркерів визначення перебігу та прогнозування ефективності лікування хворих на РМЗ, призначенні для лікарів-онкологів і видаються в Україні вперше.

ОБГРУНТУВАННЯ НЕОБХІДНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ МЕТАЛОВМІСНИХ ПРОТЕЇНІВ ДЛЯ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

На сьогодні в клінічній практиці прогнозування перебігу РМЗ базується на визначенні рівня певних позапухлинних маркерів, таких як раковий ембріональний антиген, СА-15-3, САМ26 та ін.

Специфічність диференційної діагностики злоякісних новоутворень з використанням зазначених маркерів відносно доброякісних новоутворень молочної залози складає 95 %.

В той же час відомо, що використання загальновизнаних маркерів має низку недоліків: низька чутливість та специфічність при ранніх стадіях РМЗ (20 %), можливість використання для моніторингу перебігу та ефективності лікування при генералізованих формах РМЗ. Поряд з цим, всі відомі на сьогодні позапухлинні прогностичні показники і маркери не надають інформації щодо чутливості чи резистентності пухлин молочної залози до стандартних схем НХТ.

Існує думка про те, що мідьвмісні та залізовмісні білки можуть розглядатись як потенційні маркери злоякісної прогресії та як перспективні мішені для протипухлинної терапії.

Це пов'язано з тим, що мідь потрібна для нормального перебігу багатьох фізіологічних процесів, функціонування таких життєво необхідних систем як кровотворна, імунна, для безперебійної діяльності серця, мозку та інших органів. За недостатньої кількості міді в організмі виникають анемія, нейтропенія, затримка росту, знижується опір організму до інфекцій. Обмін міді чітко регулюється різними механізмами, забезпечується внутрішньо- та

зовнішньоклітинними протеїнами, ключова роль в цьому процесі належить церулоплазміну (ЦП).

ЦП – мідьвмісний альфа-2-глобулін плазми крові (мол. маса 120,09 кДа), на його частку припадає 3 % загального вмісту міді в організмі, і понад 95 % сироватки крові. Він є донором міді для більшості клітин і основним протеїном транспорту міді. Мідь, яку переносить ЦП, використовується клітинами для синтезу багатьох ферментів, що каталізують окисно-відновні процеси (цитохромоксидази та ін.).

Крім транспортування міді, церулоплазмін також виконує каталітичну функцію при окисленні заліза (Fe^{2+} до Fe^{3+}) і проявляє фероксидазну активність, водночас відновлюючи кисень до води. Завдяки фероксидазній активності ЦП забезпечує насичення залізом молекули трансферину (ТФ) та мобілізацію заліза з ретикуло-ендотеліальної системи.

ТФ транспортує залізо у кістковий мозок, де відбувається синтез гему. Таким чином, ЦП бере участь в утилізації заліза та кровотворенні. За даними клінічних досліджень зміни рівня ЦП у сироватці крові онкологічних хворих можуть слугувати маркерами агресивності РМЗ та чутливості до протипухлинної терапії.

Не менш важливим незамінним мікроелементом, який забезпечує багатогранність біологічних функцій та реакцій організму і відіграє провідну роль у патогенезі ряду захворювань, у тому числі онкологічних, є залізо. Важлива роль цього хімічного елементу в процесах росту та поділу клітин, перш за все, пов'язана з тим, що залізовмісні білки задіяні в забезпеченні функції дихання, синтезу ДНК, клітинної загибелі та оксидативного стресу. Залізо здатне ініціювати і підтримувати формування гідроксильних радикалів, які можуть запускати ланцюгові реакції перекисного окислення ліпідів, порушуючи структурну та функціональну цілісність клітин. Залізо

супресує дію Т-хелперів, впливає на функцію макрофагів і моноцитів. Рівень заліза в біопсійному матеріалі РМЗ у 5 разів перевищує рівень цього мікроелементу в тканині доброякісних пухлин. Зменшення рівня заліза в сироватці крові пов'язано з високою вірогідністю рецидиву РМЗ у хворих пременопаузального періоду, тоді як збільшення сироваткового рівня заліза може призводити до розвитку РМЗ у жінок постменопаузального періоду.

Численними дослідженнями останніх років доведена роль порушень обміну ендogenous заліза та активних форм кисню в реалізації цитотоксичних ефектів таких протипухлинних препаратів, як паклітаксел, етопозид та доксорубіцин.

Існують дані, що концентрація заліза та білків, які беруть участь в його регуляції у сироватці крові та пухлинній тканині, корелює з агресивністю РМЗ. Основна роль у регуляції обміну заліза належить феритину (ФЕР), ТФ та гепсидину.

ТФ – розчинний у воді залізопротеїн (мол. маса 90 кДа), глікопротеїн, що виявляється головним чином у сироватці крові у складі β -глобулінів. Вміст заліза в ньому становить 0,13 %. Припускають, що атом заліза з'єднується з білком координаційними зв'язками за участю гідроксильних груп тирозину. Молекула трансферину містить 2 атоми заліза. ТФ слугує фізіологічним переносником заліза в організмі.

Синтез ТФ здійснюється в печінці і залежить від її функціонального стану, від потреби в залізі, а також резервів заліза в організмі. При зниженні концентрації заліза синтез ТФ зростає. ТФ бере участь у транспорті заліза від місця його всмоктування (тонка кишка) до основних місць його використання або зберігання (кістковий мозок, печінка, селезінка), перешкоджаючи накопиченню токсичних іонів заліза в крові. При руйнуванні еритроцитів в селезінці, печінці і кістковому мозку ТФ

транспортує залізо, що вивільняється з гема, в кістковий мозок; де частина заліза депонується, включаючись до складу ФЕР і гемосидерину.

ФЕР – водорозчинний білок з молекулярною масою 450 кДа, здатний приєднувати до 4500 атомів заліза на молекулу, що пов'язано з його біологічною функцією. Ця функція полягає в депонуванні заліза, токсичного для організму, в розчинній, безпечній та фізіологічно доступній формі. Молекула ФЕР складається з двох компонентів: апоферитину і кристалічної "серцевини" у вигляді колоїдного гідроксиду заліза.

Повністю насичена залізом молекула ФЕР містить заліза до 27 % своєї молекулярної маси. ФЕР виконує в організмі подвійну функцію. Він запасує в клітинах розчинне залізо, яке при необхідності може бути легко задіяне для синтезу різних речовин. Водночас ФЕР захищає організм від токсичної дії іонів металів. Крім заліза ФЕР здатний зв'язувати і інші іони, деякі з яких токсичні (алюміній, берилій). ФЕР вважається білком гострої фази запалення і підвищується як внутрішньоклітинно так і позаклітинно внаслідок секреції багатьма типами клітин.

Важливу роль ФЕР відіграє в обмеженні доступності заліза в результаті його зв'язування. Крім того, він може модулювати багато імунних функцій, бере участь в онтогенезі. Рівень ФЕР у сироватці крові прямо пропорційний вмісту заліза, підвищується за наявності ряду патологічних процесів, у тому числі онкологічних. Існують дані, що у хворих на РМЗ з агресивним клінічним перебігом та несприятливим прогнозом зниження рівня ТФ в сироватці крові зворотно корелює з підвищенням рівня ФЕР.

Гепсидин – гормоноподібний пептид (мол. маса 470 кДа), що складається з 25 амінокислотних залишків, з високим вмістом цистеїну. У сироватці крові здорових людей він присутній у кількості від 17 до 286 нг/мл.

Синтез гепсидину індукується за умов перевантаження організму залізом, що підтверджує участь цього білка у регуляції метаболізму заліза.

В нормі синтез гепсидину відбувається в основному в гепатоцитах, але він може синтезуватись у клітинах багатьох органів (серце, легені, головний та спинний мозок, кишківник, яєчники, шлунок, підшлункова залоза, скелетні м'язи, сім'яники), а також у моноцитах, нейтрофілах, макрофагах та лімфоцитах.

Механізм активації гепсидину складний і залежить від його взаємодії з ферропортином. Ферропортин є єдиним експортером клітинного заліза, який синтезується в макрофагах, гепатоцитах, ентероцитах дванадцятипалої кишки і клітинах плаценти.

Гепсидин регулює посттрансляційну експресію ферропортину. Зв'язуючись з цим білком, він викликає його інтерналізацію та деградацію в ендолізосомах, що, в свою чергу, блокує транспорт заліза. Підтримка та регуляція метаболізму заліза в організмі здійснюється за безпосередньої участі гепсидину.

Отже, визначення спектру металовмісних білків у периферичній крові хворих на РМЗ та використання їх в якості маркерів чутливості до хіміотерапії та моніторингу перебігу – актуальна і перспективна проблема.

1. Визначення рівня металовмісних білків у хворих на РМЗ з використанням імуноферментного методу

Імуноферментний аналіз (ІФА) на сьогодні є одним з широко використовуваних та високоточних методів визначення рівня білків в сироватці крові. Уніфікованість, відтворюваність, а також висока чутливість і специфічність дозволяють за допомогою цього методу отримувати

об'єктивну інформацію щодо перебігу та ефективності лікування. ІФА застосовують при діагностиці та диференційній діагностиці онкологічних захворювань, моніторингу їх перебігу, а також для оцінки прогнозу, ранньої діагностики рецидивів і метастазів солідних новоутворень будь-якої локалізації.

1.1.Опис методики

Для дослідження рівнів металовмісних протеїнів, які приймають участь в регуляції метаболізму заліза та міді, у хворих на РМЗ методом ІФА використовують венозну кров.

1. Забір крові проводять натщесерце.
2. Кров в об'ємі 10 мл забирають у пробірки з K_3 EDTA 16,2 мг.
3. Застосовуються голки з великим діаметром (20-22G) для запобігання пошкодження еритроцитів.
4. Проби крові зберігати не більше 24 год. з моменту забору при температурі $+2^{\circ}$ до $+8^{\circ}C$.
5. Сироватку крові відокремлюють від еритроцитів центрифугуванням (20 хв. при 1500 об/хв).
6. Сироватку крові слід відбирати після відстоювання крові в термостаті при $37^{\circ} C$ протягом 1 години.
7. Зберігають сироватки при температурі від $+2^{\circ}$ до $+8^{\circ}C$ протягом 5-7 діб, при більш тривалому зберіганні можливе бактеріальне проростання.
8. Для тривалого зберігання сироватку заморожують при температурі $-20^{\circ} C$.

Не рекомендується заморожувати і розморожувати сироватку крові кілька разів, так як багаторазове розморожування призводить до руйнування антигенів і антитіл, зміни складу проб і хибних результатів.

9. Дослідження рівня металовмісних білків проводять із застосуванням стандартних наборів у відповідності до рекомендованих протоколів реагентів.

10. Визначення виконують за допомогою автоматичного імуноферментного аналізатора.

2. Дизайн дослідження

2.1. Клінічна характеристика хворих

Проведено аналіз результатів обстеження, лікування і виживаності 276 хворих на РМЗ I-III стадії (I стадія — 42, II — 149 та III — 85 пацієнтів, відповідно), яким проводили стаціонарне лікування у Київському міському клінічному онкологічному центрі протягом 2013-2015 рр.

Всі пацієнтки були обстежені з використанням загальноприйнятих клінічних і лабораторних методів згідно з стандартами діагностики і лікування онкологічних хворих, затверджених наказами МОЗ України: Наказ МОЗ України від 17.09.2007 № 554 Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "онкологія", Наказ МОЗ України від 30.07.2010 № 645 Про внесення змін до наказу МОЗ України від 17.09.2007 № 554 "Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "онкологія", Наказ МОЗ України від 30.06.2015 № 396 "Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при раку молочної залози".

За верифікованого патогістологічного діагнозу перед оперативним втручанням у пацієнтів, які не отримували НХТ (усі хворі на РМЗ I стадії (42) та 109 (73,2 %) хворих на РМЗ II стадії, від загальної кількості 149), проводили визначення рівня металовмісних білків (ЦП, ТФ, ФЕР, гепсидин) у сироватці крові за допомогою методу ІФА.

Залежно від клінічних показань усім хворим на РМЗ I-II стадій проводили органозберігаючі операції або радикальні мастектомії за Маденом і ад'ювантну поліхіміотерапію (ПХТ) згідно зі стандартами лікування, прийнятими в Україні, за схемами FAC (фторурацил, доксорубіцин, циклофосфамід) та AC (доксорубіцин, циклофосфамід) з інтервалом в 21 день, кількість курсів ПХТ коливалась від 4 до 6.

Усім хворим проводили післяопераційне променеве лікування на гамма-терапевтичному апараті (разова вогнищева доза — 2 Гр, сумарна

вогнищева доза – 40 Гр на область післяопераційного рубця, пахвову, парастернальну та надключичну області).

Стадію пухлинного процесу визначали за Міжнародною класифікацією злоякісних новоутворень TNM-7 (2009 р.). Гістологічний тип видалених пухлин верифікували при морфологічному дослідженні гістологічних зрізів парафінових блоків пухлин (фарбування зрізів гематоксином та еозином) відповідно до Міжнародної гістологічної класифікації ВООЗ (2006 р.).

Для оцінки молекулярного підтипу РМЗ використовували гістологічні зрізи (товщина 4 мікрони) парафінових блоків операційного матеріалу, які підлягали імуногістохімічному дослідженню експресії рецепторів естрогенів, прогестерону, епідермального фактору росту типу 2 (Her2/neu) та Ki-67, застосовуючи антитіла antiHER/2neu. Для оцінки експресії маркерів використано напівкількісний метод.

Оцінку результатів проводили за допомогою оптичної мікроскопії (x400) з використанням класичного методу H-Score.

За позитивну експресію маркера вважали кількість позитивних пухлинних клітин $> 10\%$.

40 (26,8%) хворих на РМЗ II стадії та всі 85 хворих III стадії отримували НХТ. Курс НХТ включав 2-6 циклів за схемою FAC, AC з інтервалом в 21 день.

Ефективність НХТ оцінювали через кожні 2 цикли за даними мамографії згідно з критеріями RECIST. За верифікованого патогістологічного діагнозу перед першим курсом НХТ у всіх хворих на РМЗ II-III стадії проводили визначення рівнів металовмісних білків у сироватці крові за допомогою ІФА.

Усі хворі надали поінформовану згоду на використання сироватки крові та хірургічного матеріалу в дослідницьких цілях.

3. Зв'язок рівнів металовмісних білків у сироватці крові хворих з клініко-морфологічними показниками РМЗ

Для визначення прогностичного значення та можливості використання металовмісних протеїнів у якості маркерів перебігу РМЗ проведено дослідження рівня ФЕР, ТФ, ЦП та гепсидину у сироватці крові 151 хворої на РМЗ (усі хворі на РМЗ I стадії (42) та 109 (73,2 %) хворих на РМЗ II стадії, від загальної кількості 149). Рівень металовмісних білків досліджували залежно від основних клініко-патологічних параметрів РМЗ, а саме: вік пацієнток, менструальний статус хворих, стадія РМЗ, наявність метастазів у регіонарних лімфатичних вузлах, ступінь диференціювання пухлин, їх гістологічна будова та молекулярний підтип.

При аналізі концентрації металовмісних білків у сироватці крові в загальній групі хворих на РМЗ встановлено, що показники ФЕР, ЦП та гепсидину були достовірно вищими за максимальні референтні значення у 184(66,7%) пацієнток, 162(58,7%)пацієнток та 155(56,2%) пацієнток, відповідно (Рис. 1). В той же час, рівень ТФ в сироватці крові 172 (62,3 %) хворих був, навпаки, нижче за показники норми (2,5-3,8 г/л).

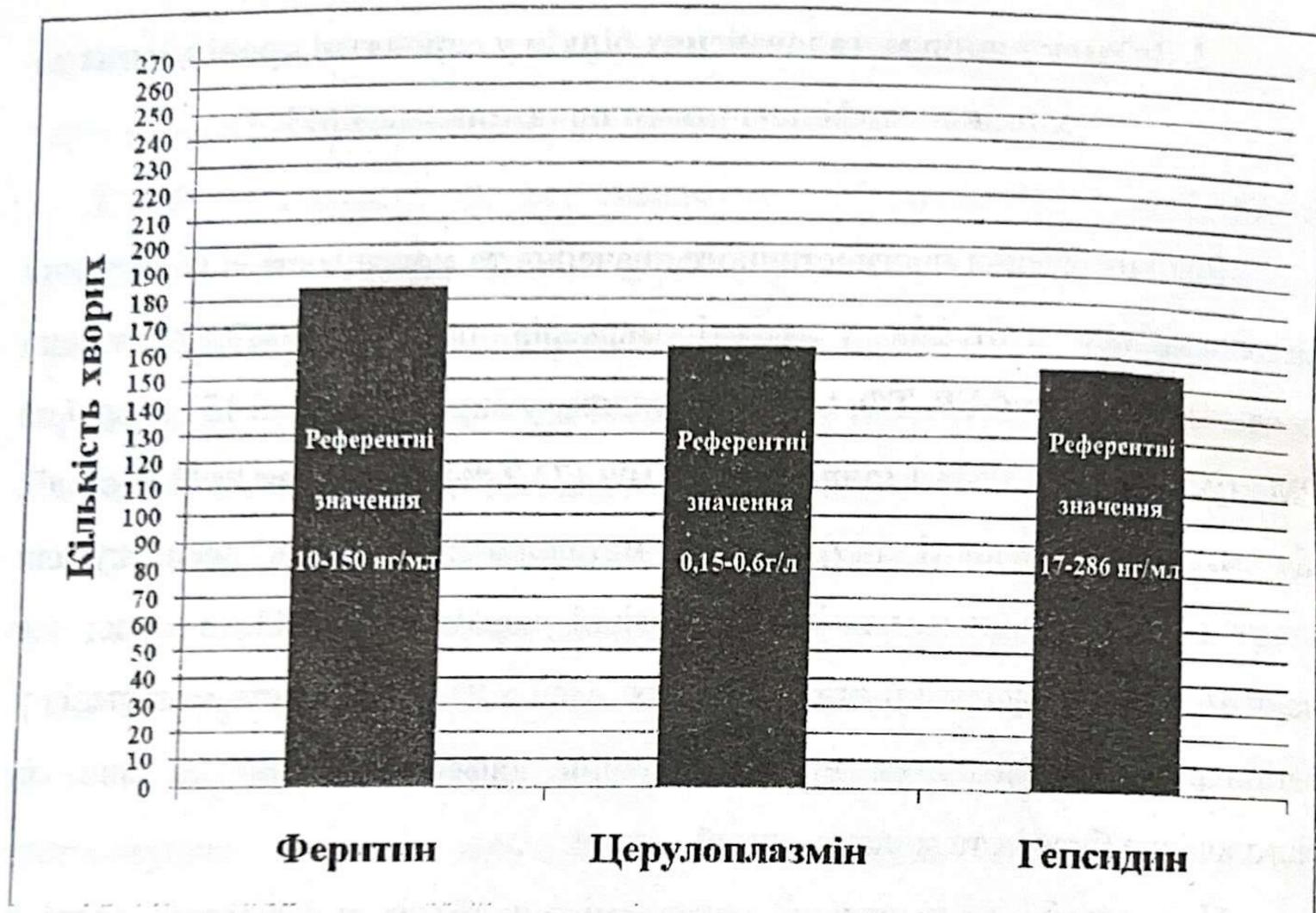


Рис.1. Кількість хворих на РМЗ із показниками металовмісних білків у сироватці крові, вищих за референтні

Визначена залежність показників ФЕР та ТФ в сироватці крові від віку досліджених хворих на РМЗ (табл. 1). Рівень ФЕР прогресивно підвищувався зі збільшенням віку хворих, максимальна концентрація ТФ ($4,5 \pm 3$ г/л) була в сироватці крові пацієток вікової групи 51–60 років ($r=0,37$; $p \leq 0,05$). Найбільш високі показники ЦП та гепсидину спостерігалися в сироватці крові 88/59,1% хворих на РМЗ II стадії ($r=0,33$ та $r=0,61$, відповідно; $p \leq 0,05$), проте, підвищення концентрації ТФ, навпаки, виявлено у хворих на РМЗ I стадії ($r=-0,38$).

Збільшення рівня ЦП в сироватці крові асоціюється з розвитком регіонарних метастазів у лімфатичні вузли ($r=0,49$; $p \leq 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1

Рівні металовмісних білків залежно від клініко-морфологічних особливостей РМЗ (n=151)

Клініко-морфологічні показники		Рівень металовмісних білків у сироватці крові			
		ФЕР (нг/мл)	ТФ (г/л)	ЦП (г/л)	Гепсидин (нг/мл)
Вік хворих (роки)	<50	166,7±5	3,2±0,5	0,43±0,05	231,4±19
	51-60	175,3±6	4,5±0,3*	0,48±0,06	227,1±11
	61-89	187,2±4*	3,0±0,2	0,47±0,04	233,3±17
Стадія захворювання	I (n=42)	176,0±15,7	4,5±0,2*	0,4±0,09	137,7±18
	II (n=109)	181,7±12,5	2,7±0,23	0,52±0,03*	318,4±14*
Наявність регіонарних метастазів	відсутні	173,7±14	3,4±0,4	0,35±0,08	227,7±11
	метастази у регіонарні лімфатичні вузли	184,3±13	3,8±0,8	0,57±0,09*	233,9±17
Гістологічна структура пухлини	протокова карцинома	183,4±15	2,7±0,2*	0,45±0,02	263,1±21*
	долькова карцинома	174,4±11	4,4±0,4	0,47±0,03	198,3±18
Ступінь диференціювання	високий (G1)	146,8±19	3,3±0,4	0,44±0,04	234,6±12
	помірний (G2)	161,3±10	3,7±0,3	0,46±0,06	231,7±11
	низький (G3)	230,9±18*	3,8±0,6	0,47±0,03	226,4±9

* - рівень значимості коефіцієнта кореляції $p < 0,05$

Подальший аналіз дозволив встановити залежність рівня деяких металовмісних білків у сироватці крові від гістологічного типу РМЗ та його ступеня диференціювання.

Так, у хворих з інфільтративною протоковою карциномою спостерігали підвищення рівня гепсидину ($r=0,38$; $p \leq 0,05$) та зниження концентрації ТФ ($r=-0,33$; $p \leq 0,05$) порівняно з пацієнтками, у яких діагностовано інфільтративний дольковий РМЗ (табл. 1). Концентрації ФЕР та ЦП не залежали від гістологічного типу РМЗ. Найбільш високі рівні ФЕР були у сироватці крові хворих на низькодиференційований РМЗ, порівняно з

пухлинами помірного та високого ступеня диференціювання ($r=0,46$; $p \leq 0,05$) (табл. 1).

Поряд із цим, доведено кореляційний зв'язок концентрації досліджених металовмісних білків від молекулярного підтипу РМЗ (табл. 2). У хворих на РМЗ базального підтипу середні показники ФЕР ($r=0,52$; $p \leq 0,05$), ЦП ($r=0,48$; $p \leq 0,05$) та гепсидину ($r=0,49$; $p \leq 0,05$) були достовірно вище за максимальні референтні значення і склали відповідно $234,9 \pm 24,3$ нг/мл, $0,62 \pm 0,03$ г/л та 350 ± 8 нг/мл. У хворих на люмінальний А та Her2/neu-позитивний підтипи РМЗ середні рівні ТФ та ЦП були підвищені ($4,9 \pm 0,5$ г/л та $0,59 \pm 0,05$ г/л, відповідно).

Таблиця 2

Рівні металовмісних білків залежно від молекулярного підтипу РМЗ

Молекулярний підтип РМЗ	Рівень ФЕР (нг/мл)	Рівень ТФ (г/л)	Рівень ЦП (г/л)	Рівень гепсидину (нг/мл)
Люмінальний А	$157,6 \pm 22,1$	$4,9 \pm 0,5^*$	$0,38 \pm 0,03$	$183,1 \pm 18$
Люмінальний Б	$158,8 \pm 19,1$	$3,1 \pm 0,3$	$0,28 \pm 0,02$	$190,4 \pm 22$
Базальний	$234,9 \pm 24,3^*$	$2,8 \pm 0,2$	$0,62 \pm 0,03^*$	$349,8 \pm 15^*$
Her2/neu +	$164,7 \pm 17,8$	$3,6 \pm 0,4$	$0,59 \pm 0,05^*$	$200,2 \pm 17$

* - $p < 0,05$ – порівняно з іншими молекулярними підтипами

Отже, дані щодо зв'язку рівня металовмісних білків у сироватці крові з деякими клініко-морфологічними показниками і молекулярним підтипом РМЗ свідчать про те, що наявність високих рівнів ФЕР, ЦП та гепсидину, а також зниження показників ТФ є маркерами несприятливого прогнозу перебігу захворювання.

4. Визначення зв'язку рівнів гепсидину та феритину в сироватці крові хворих на РМЗ з чутливістю до неоад'ювантної хіміотерапії

Для визначення прогностичного значення та можливості використання металовмісних протеїнів у якості позапухлинних маркерів чутливості до цитостатиків 125 хворих на РМЗ II-III стадії (II стадія — 40 та III — 85 пацієнтів відповідно) було розподілено на 2 групи залежно від ступеня вираженості клінічного ефекту неоад'ювантного лікування.

Першу групу склали 58 хворих на РМЗ, що мали позитивну відповідь на хіміотерапію (повна та часткова регресія пухлини за критеріями RECIST).

Другу групу склали 67 жінок з пухлинами, резистентними до проведеного лікування (спостерігалася стабілізація та прогресування росту пухлини за критеріями RECIST).

Аналіз отриманих даних дозволив встановити зв'язок деяких показників металовмісних білків у сироватці крові з чутливістю до НХТ у хворих на РМЗ.

Найвищі показники сироваткових ФЕР та гепсидину були в групі хворих резистентних до НХТ (табл. 3).

Зокрема, на початку лікування перед першим курсом хіміотерапії середня концентрація сироваткового ФЕР у хворих цієї групи була на рівні 278,3 нг/мл (256,4 нг/мл — у хворих зі стабілізацією пухлинного росту та 287,2 нг/мл — у хворих з прогресією росту пухлини).

Наприкінці лікування у хворих з резистентними пухлинами спостерігали підвищення рівня ФЕР в сироватці крові (до 294,7 нг/мл у хворих зі стабілізацією росту пухлини та до 351,9 нг/мл — у хворих з прогресією пухлини на фоні проведеного лікування). Разом з тим, у хворих з чутливими пухлинами на початку лікування перед першим курсом НХТ середня концентрація сироваткового ФЕР була на рівні 153,0 нг/мл (183,4 нг/мл — у хворих з частковою та 140,2 нг/мл — з повною регресією пухлини). Наприкінці неоад'ювантного лікування у хворих з чутливими пухлинами спостерігали

зниження рівня показників сироваткового ФЕР (у 2,3 та 1,2 рази у хворих з повною та частковою регресією пухлини, відповідно).

Таблиця 3

Вміст металовмісних білків в сироватці крові хворих на РМЗ залежно від клінічного ефекту НХТ (n=125)

	Відповідь пухлини на терапію (за критеріями RECIST), кількість хворих n(%)			
	повна регресія	часткова регресія	стабілізація	прогресування
Нормальний сироватковий ФЕР	4 (66,7)	31 (59,6)	19 (42,2)	11 (50,0)
Підвищений сироватковий ФЕР	2 (33,3)	21 (40,4)	26 (57,8)	11 (50,0)
Концентрація сироваткового ФЕР, нг/мл (мін-макс)	153,0 (13,0-341)		278,3 (15,0-786,0)	
Нормальний сироватковий ТФ	2(33,3)	27 (51,9)	20 (44,4)	9 (40,9)
Підвищений сироватковий ТФ	4 (66,7)	25 (48,1)	25 (55,6)	13 (69,1)
Концентрація сироваткового ТФ, г/л (мін-макс)	3,1 (2,2-4,0)		3,5 (2,6-4,2)	
Нормальний сироватковий ЦП	3 (50,0)	27 (51,9)	28 (62,2)	7 (31,8)
Підвищений сироватковий ЦП	3 (50,0)	25 (48,1)	17 (37,8)	15 (68,2)
Концентрація сироваткового ЦП,г/л (мін-макс)	0,45 (0,26-0,62)		0,48 (0,31-0,53)	
Нормальний сироватковий гепсидин	5 (83,3)	37 (71,2)	20 (44,4)	12 (54,5)
Підвищений сироватковий гепсидин	1 (16,7)	15 (28,8)	25 (55,6)	10 (45,5)
Концентрація сироваткового гепсидину, нг/мл (мін-макс)	180,0 (80-298)		420,5 (300-680)	

У групі хворих з резистентними до НХТ пухлинами також відзначали високі показники сироваткового гепсидину (табл. 3).

На початку лікування перед першим курсом НХТ середня концентрація сироваткового гепсидину в хворих цієї групи була на рівні 420,5 нг/мл (325,4 нг/мл – у хворих зі стабілізацію пухлинного росту та 385,2 нг/мл – у хворих з прогресією росту пухлини).

В протилежність цьому, у пацієток з чутливими пухлинами на початку лікування перед першим курсом НХТ середня концентрація сироваткового гепсидину була на рівні 180,0 нг/мл (210,4 нг/мл – у хворих з частковою та 140,2 нг/мл – з повною регресією пухлини).

Слід зазначити, що позитивний терапевтичний ефект (повна або часткова регресія) частіше спостерігали у тих хворих, у яких рівень сироваткового гепсидину перебував у межах норми (74,2 нг/мл у хворих з повною регресією, 62,9 нг/мл – з частковою), тоді як підвищений рівень сироваткового гепсидину частіше був пов'язаний зі стабілізацію (52,3 нг/мл) або прогресією (57,4 нг/мл) пухлинного процесу. Проведений статистичний аналіз засвідчив існування достовірних кореляційних зв'язків між концентрацією сироваткового ФЕР і гепсидину та чутливістю пухлини до НХТ ($r=0,54$ та $r=0,57$; $p<0,05$). Не виявлено залежності між рівнем ЦП і ТФ та чутливістю хворих на РМЗ до НХТ: середній рівень цих білків у групі хворих на РМЗ з чутливими та резистентними пухлинами практично не відрізнявся (табл. 3).

Отримані дані щодо зв'язку рівня металовмісних білків із клініко-патологічними показниками, молекулярним підтипом і чутливістю РМЗ до неoad'ювантної хіміотерапії свідчать про можливість використання цих показників в якості об'єктивних критеріїв визначення чутливості РМЗ до хіміотерапії на рівні організму, що дозволить забезпечити поліпшення результатів лікування цього контингенту хворих та знизити загальну токсичність, тобто про перспективність їх використання як додаткових прогностичних маркерів перебігу пухлинного процесу.

Практичні рекомендації

1. Для оцінки потенціалу злоякісності РМЗ та потенційного ризику розвитку метастазів у регіонарні лімфатичні вузли необхідним етапом комплексного обстеження хворих поряд із діагностикою гістологічного типу і молекулярного підтипу пухлин є визначення в сироватці периферичної крові хворих на РМЗ концентрації ФЕР, ТФ, ЦП та гепсидину.
2. З метою встановлення індивідуальної чутливості до неоад'ювантної поліхіміотерапії (режими FAC/AC) необхідним є визначення в сироватці периферичної крові хворих на РМЗ концентрації ФЕР та гепсидину.
3. Дослідження концентрації ФЕР, ТФ, ЦП та гепсидину в сироватці периферичної крові хворих на РМЗ потребують включення до переліку методів обстеження хворих на РМЗ для прогнозування перебігу злоякісного процесу та планування індивідуалізованого лікування.

Висновки

1. Збільшення у сироватці крові концентрацій металовмісних білків (ФЕР, ЦП, гепсидин) вище за максимальні референтні значення відповідно у 127(66,5%), 110(57,6%) та 108(56,5 %) хворих на РМЗ I-II стадій та зниження ТФ у 172(62,3%) свідчить про їх асоціацію з пухлинним ростом та потенційну можливість використання в якості позапухлинних маркерів.

2. Встановлено зв'язок рівня металовмісних білків у периферичній крові хворих з основними клініко-морфологічними характеристиками РМЗ. Для хворих з інфільтративним протоковим РМЗ характерним є зниження концентрації ТФ. Високі показники ЦП і гепсидину частіше спостерігаються у хворих на РМЗ II стадії (у 88(59,1%) та 106(71,1%) випадків). Підвищення у сироватці крові рівнів ФЕР спостерігається у хворих на РМЗ низького ступеня диференціювання, а ЦП та гепсидину – інфільтративному протоковому РМЗ; високий вміст циркулюючого ЦП корелює з наявністю метастатичного ураження регіонарних лімфатичних вузлів.

3. Високі концентрації ФЕР, ЦП та гепсидину характерні для хворих на базальний РМЗ, підвищення рівня ЦП та ТФ спостерігається при Her2/neu-позитивних пухлинах, що свідчить про наявність асоціативного зв'язку рівнів металовмісних білків з молекулярним фенотипом РМЗ.

4. Підвищений рівень ФЕР та гепсидину в сироватці крові свідчить про резистентність до неоад'ювантної терапії (режими FAC, AC) хворих на РМЗ.

5. Для оцінки агресивності перебігу РМЗ і планування індивідуалізованого лікування як етап комплексного обстеження хворих поряд з діагностикою гістологічного типу і молекулярного підтипу пухлин рекомендовано визначення рівня ЦП, ФЕР, та гепсидину в сироватці крові.

6. Необхідність використання ФЕР та гепсидину в якості позапухлинних маркерів чутливості до цитостатиків та моніторингу ефективності протипухлинного лікування у хворих на РМЗ є науково-обґрунтованою.

Перелік рекомендованої літератури

1. Рак в Україні, 2013-2014. Бюл. Національного канцер-реєстру України. № 16. - Київ, 2015. – 104 с.
2. Зв'язок сироваткового та пухлинного феритину з клініко-морфологічними та молекулярним профілем пухлин у хворих на рак молочної залози / С.В. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, С.О. Собченко і співавт. // Онкологія. – 2014. – Т. 16, № 4. – С. 275-272.
3. Зв'язок рівня феритину у сироватці крові та пухлинній тканині з чутливістю до неoad'ювантної хіміотерапії у хворих на рак молочної залози / С.В. Антіпова, О.В. Шепіль, Н.Ю. Лук'янова, В.Ф. Чехун // Онкологія. – 2013. – Т. 15, № 3. – С. 204-209.
4. Патент на винахід № 106148 UA. Спосіб прогнозування чутливості до неoad'ювантної терапії у хворих на рак молочної залози / В.Ф. Чехун, О.В. Шепіль, Н.Ю. Лук'янова, С.В. Антіпова // Бюл. промислової власності. – 2014. - № 14.
5. Патент на корисну модель № 98247 UA. Спосіб прогнозування резистентності пухлинних клітин до цисплатину та доксорубіцину / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова. – Бюл. промислової власності. – 2015. - № 14.
6. Патент на корисну модель № 103806 UA Спосіб прогнозування чутливості до неoad'ювантної терапії у хворих на рак молочної залози / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лук'янова, Т.М. Яловенко // Бюл. промислової власності. – 2015. - № 24.
7. Local-regional control according to surrogate markers of breast cancer subtypes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients undergoing breast conserving therapy / Caudle A.S., Yu Tse-Kuan, Tucker S.L. et al. // Breast Cancer Res. – 2012. – Vol. 14, № 3. - R83. doi:10.1186/bcr3198.
8. Neoadjuvant chemotherapy and bevacizumab for HER2-negative breast cancer / von Minckwitz G., Eidtmann H., Rezai M. et al. // N Engl. J. Med. – 2012. – Vol. 366, № 4. – P. 299-309.
9. Наказ МОЗ України від 17.09.2007 № 554 Про затвердження протоколів

надання медичної допомоги за спеціальністю "онкологія".

10. Наказ МОЗ України від 30.07.2010 № 645 Про внесення змін до наказу МОЗ України від 17.09.2007 № 554 "Про затвердження протоколів надання медичної допомоги за спеціальністю "онкологія".

11. Наказ МОЗ України від 30.06.2015 № 396 "Про затвердження та впровадження медико-технологічних документів зі стандартизації медичної допомоги при раку молочної залози".

Підписано до друку 14.03.2017 р. Формат 60×84/16.
Ум. друк. арк. 1.63. Наклад 200 прим.

Свідоцтво про державну реєстрацію ДК № 1149 від 12.12.2002 р.
ТОВ "ДІА"
вул. Васильківська, 45, м. Київ, 03022, Україна
тел./факс 455-91-52