

Abstract

Romaniuk A. M., Lyndin M. S. *,
Moskalenko R. A.,
Zolotarova A. V.,
Sumy State University,
2 Rymkogo-Korsakova St., Sumy,
40007, Ukraine

EVALUATION OF THE RECEPTORS ESTROGEN, PROGESTERONE AND HER-2/NEU EXPRESSION IN THE BREAST CANCER TISSUE UNDER THE INFLUENCE OF TRACE ELEMENTS ON THE BODY

The problem of breast cancer is being studied for a long time. Questions of reducing morbidity and mortality remain unresolved due to the lack of effective ways of primary prevention. As the etiological factors of breast cancer describe a huge number of reasons, including environmental factors. Some chemical substances in the environment show the estrogen-like activity in the study of biological systems. Unfortunately, relatively few researches were devoted to studying the influence of chemicals on the possibility of carcinogenesis, initiation and progression of breast cancer. We do not know how they affect the expression of important prognostic receptors. The purpose of the study was to examine the expression of receptors estrogen, progesterone and epidermal growth factor in the tissue of malignant breast tumors under the of trace elements influence on the body.

We determined the morbidity of breast cancer in Sumy region by the histological studies in women for the period from 2009 to 2013. The breast tumor tissue for the immunohistochemical study was divided into two groups. The group 1 (the breast cancer tissue of women who lived in environmentally contaminated region) included 26 cases; the group 2 (the breast cancer tissue of women who lived in the environmentally clean areas) – 17 cases. Immunohistochemical reaction occurred in two stages using rabbit antibodies. Evaluation of the expression of ER and PR was performed by the method DCAllred. Evaluation of HER-2/neu expression was performed according to the recommendations of American Pathologists Consensus and the Office of the Food and Drug USA.

The results of the study confirmed that the morbidity of breast cancer in environmentally contaminated regions almost twice higher than the environmentally clean areas of Sumy region. In addition, we found the increase in expression of epidermal growth factor and the reduction in expression of steroid hormones in environmentally contaminated region. Consequently, it proved the negative effect of trace elements on the course of breast cancer.

Key words: morbidity, tumor, expression, receptors, metals, immunohistochemistry, trace elements.

Corresponding author: * lyndin_nikolay@ukr.net

Резюме

Романюк А. М., Ліндін М. С. *,
Москаленко Р. А.,
Золотарьова А. В.,
Сумський державний
університет,
вул. Римського-Корсакова, 2,
Суми, 40007, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ РЕЦЕПТОРІВ ЕСТРОГЕНУ, ПРОГЕСТЕРОНУ ТА HER-2/NEU У ТКАНИНІ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ В УМОВАХ ВПЛИВУ СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Робота присвячена вивченню захворюваності на рак молочної залози та особливостей експресії рецепторів естрогену, прогестерону та епідермального фактора росту в тканині пухлин у жінок, які мешкають у різних регіонах Сумської області. Виявлено, що в «екологічно чистих» районах випадки раку трапляються майже у два рази рідше. Результати проведеного імуногістохімічного дослідження показали, що у хворих, які мешкають в «екологічно забруднених» районах, спостерігається підвищення частоти гіперекспресії епідермального фактора росту та зниження експресії рецепторів естрогену та прогестерону. Це свідчить про несприятливий вплив сполук важких металів на перебіг раку молочної залози та гірший терапевтичний прогноз.

Ключові слова: захворюваність, пухлина, експресія, рецептори, метали, імуногістохімія, мікроелементи.

Резюме

Романюк А. Н.,
Льндин Н. С. *,
Москаленко Р. А.,
Золотарева А. В.,
Сумский государственный
университет,
ул. Римского-Корсакова, 2,
40007, Сумы, Украина

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ЭСТРОГЕНА, ПРОГЕСТЕРОНА И HER-2/NEU В ТКАНЯХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Работа посвящена изучению заболеваемости раком молочной железы и особенностей экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона и эпидермального фактора роста в ткани опухолей у женщин, проживающих в разных регионах Сумской области. Выведено, что в «экологически чистых» районах случаи рака встречаются почти в два раза реже. Результаты проведенного иммуногистохимического исследования показали, что у больных, проживающих в «экологически загрязненных» районах, наблюдаются повышение частоты гиперэкспрессии эпидермального фактора роста и снижение экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона. Это указывает на неблагоприятное воздействие соединений тяжелых металлов на течение рака молочной железы и худший терапевтический прогноз.

Ключевые слова: заболеваемость, опухоль, экспрессия, рецепторы, металлы, иммуногистохимия, микроэлементы.

Автор, відповідальний за листування: *lyndin_nikolay@ukr.net

Вступ

Рак молочної залози (РМЗ) займає перше місце серед усіх локалізацій злоякісних пухлин у жінок (30 % захворюваності і 16–18 % смертності). Це друге за частотою після раку легень онкологічне захворювання в популяції взагалі (враховуючи чоловіче населення). Щороку цю патологію виявляють у 16 тис. українок (Україна за показниками

захворюваності на РМЗ посідає 5-те місце у світі і становить 64,5 на 100 тис. жіночого населення) [1]. Проблеми РМЗ приділяється багато уваги, але до цього часу невирішеними залишаються питання зниження захворюваності та зростання смертності унаслідок відсутності ефективних шляхів первинної профілактики [2].

Як етіологічні чинники виникнення РМЗ описують порушення харчування, гормональні

розлади, вірусну контамінацію, спадкову схильність, фактори зовнішнього середовища [3, 4, 5, 6].

Порушення гормонального гомеостазу, які супроводжуються підвищенням кількості естрогену, прогестерону та інших гормонів, стимулюють проліферацію епітелію молочної залози, підвищуючи ризик канцерогенезу [7].

Неопластичні захворювання молочної залози безперечно є екологічно залежною патологією, про що свідчить їх стабільне зростання у розвинених країнах світу [8]. Значні темпи індустріального розвитку, видобутку мінеральної сировини та енергетичних ресурсів призвели до антропологічних навантажень на довкілля. Це зумовило забруднення ґрунтів, поверхневих водних ресурсів і, як наслідок, продуктів харчування людини сполуками важких металів. У зв'язку з цим постійно зростає інтерес до вивчення впливу важких металів на організм. Іноді дисбаланс мікроелементів (МЕ) у тканинах має природне біогеохімічне походження – за умов проживання людини на території з підвищеним вмістом важких металів тощо. При вивченні стану навколишнього середовища в Сумській області встановлено, що в Середино-Будському, Шосткинському, Ямпільському районах відмічається підвищення в ґрунті солей заліза, хрому, міді, свинцю та цинку [9, 10].

Серед багатьох причин розвитку РМЗ мікроелементози важкими металами займають не останнє місце [11]. Дослідження, проведені вченими Домініканського та Каліфорнійського університетів, показують, що клітини РМЗ стають більш агресивними, якщо вони довго піддаються впливу малих концентрацій важких металів, які часто зустрічаються в косметиці, продуктах харчування, воді та повітрі [12]. Спроможність мікроелементів імітувати дію естрогену [13], підсилювати проліферативну активність клітин [14], впливати на процеси апоптозу та проліферативну активність призводить до стимулювання пухлинної трансформації, ініціації та прогресії [15].

Основна роль у регуляції росту і розвитку залози належить естрогену, прогестерону і пролактину, які підпорядковуються дії гіпоталамуса (рилізінг-гормони) та гіпофіза (фолікулостимулювальний та лютеїнізуючий гормони) відповідно до періодів менструального циклу. Естроген стимулює ріст та розвиток проток і сполучної тканини, прогестерон –

залозистої тканини, збільшення числа альвеол, ріст часток. Основна роль пролактину – стимуляція секреції молока лактоцитами [16]. Під впливом гормональних зрушень порушуються процеси фізіологічної еволюції та інволюції в молочних залозах, розвиваються вогнища проліферації епітелію. Накопичуючись упродовж багатьох років, ці зміни призводять до розвитку дисгормональних захворювань, а в ряді випадків на їхньому фоні розвивається рак [17].

Рецептори до естрогену (ER) та прогестерону (PR) опосередковують дію стероїдних гормонів, впливаючи на диференціювання, зростання, біосинтез білка, адаптацію клітини при зміні метаболічних умов. У нормі в епітелії молочної залози спостерігається невисока експресія естрогену та прогестерону (7–30 % клітин залежно від фази циклу або гормонального фону), тоді як при пухлинній трансформації значно підвищується експресія обох маркерів, що корелює з гістологічним диференціюванням пухлини та гормональною терапією, особливо у жінок у постменопаузному періоді [18]. Естроген- і прогестерон-рецепторний статус пухлини молочної залози вважаються одними із найпотужніших прогностичних маркерів: у разі наявності естроген- або прогестерон-позитивної пухлини остання є керованою і контрольованою антигормональними препаратами [19]. Достовірним є також той факт, що ступінь експресії рецепторів до стероїдних гормонів зворотно пропорційний ступеню анеуплоїдії ракових клітин [20].

Висловлюється припущення, що висока частота РМЗ і захворюваність у країнах Західного світу пов'язані з гормональними порушеннями у зв'язку з наявністю «екологічних естрогенів» (ряд хімічних речовин у навколишньому середовищі демонструють естрогеноподібну активність при випробуванні в біологічних системах) [21]. Дослідження деяких вчених доводять, що такі метали, як кобальт, мідь, нікель, хром, свинець, ртуть, олово та ванадій, можуть бути членами цього «класу ендокринної системи» [22].

Епідермальний фактор росту (HER-2/neu) є найбільш вивченим геном сімейства рецепторів епідермального фактора росту. Його підступність полягає не тільки у здатності стимулювати пухлину до самозростання, але також у залученні стромы в експресію

рецепторів до самого фактора з наступною "опосередкованою" індукцією пухлинного росту (так званий "подвійний" механізм пухлинної прогресії) [23]. При позитивному HER-2/neu статусі 5-річне виживання становить 56 %, при негативному – 73 %. Експресія HER-2/neu свідчить про резистентність пухлини до хіміотерапії, у тому числі до тамоксифену [24]. У літературі описують випадки кореляційного зв'язку експресії HER-2/neu рецепторів з патологічним збільшенням внутрішньоклітинного вмісту ME, що свідчить про їхній взаємозв'язок у прогресуванні пухлинного росту [25].

Досить добре з'ясований вплив зазначених факторів на нирки, печінку, гіпофіз, наднирникові залози, кісткову систему, кров, органи травлення. На жаль, відносно мало досліджень присвячено вивченню впливу хімічних речовин на можливість канцерогенезу, ініціювання та прогресування РМЗ, у тому числі як вони впливають на експресію прогностично важливих та терапевтично залежних рецепторів тканини молочної залози.

Ураховуючи вищезазначене, метою нашого дослідження є вивчення особливостей експресії ER, PR та HER-2/neu тканиною злоякісних пухлин молочної залози в умовах забруднення довкілля сполуками важких металів.

Матеріали і методи

Захворюваність на РМЗ у Сумській області визначалася на підставі результатів гістологічного дослідження тканини пухлин молочної залози у жінок за період з 2009 по 2013 рік.

Аналіз гістологічних форм РМЗ проводили в «екологічно-забруднених» (Середино-Будському, Шосткинському, Ямпільському) та «екологічно чистих» (Краснопільському, Тростянецькому та Великописарівському) районах.

Тканина пухлин молочної залози для проведення імуногістохімічного (ІГХ) дослідження була розподілена на дві групи. Перша група (тканина РМЗ жінок, які мешкають в «екологічно забруднених» районах області) включала 26 випадків, друга (тканина РМЗ жінок, які мешкають в «екологічно чистих» районах) – 17 випадків.

Матеріал, отриманий оперативним шляхом, упродовж 24 годин фіксувався в 10 % нейтральному формаліні, після чого виготовлялися парафінові блоки. Для

проведення ІГХ дослідження виготовляли зрізи товщиною 3–4 мкм, які підлягали стандартній депарафінації та зневодненню у ксилолі та спиртах зростаючої концентрації. Імуногістохімічна реакція проходила в 2 етапи: I – інкубування з первинними кролячими антитілами в розведенні 1:100 (клон SP1 – для визначення ER, клон YR85 – для PR, клон SP3 – для HER-2/neu) упродовж 30 хвилин ($t = 37^{\circ}\text{C}$); II – інкубування із вторинними антитілами (UltraVision ONE HRP Polymer) – 30 хвилин ($t = 37^{\circ}\text{C}$). Як хромоген використано діамінобензидин ($t = 37^{\circ}\text{C} - 10$ хвилин) з дофарбовуванням негативно пофарбованих ядер гематоксиліном Маєра.

Оцінку експресії ER та PR проводили за способом D. C. Allred з урахуванням частки забарвлених ядер та інтенсивності їх забарвлення. Вважали негативною реакцією суму балів 0–2, слабо позитивною – 3–4 бали, позитивною – 5–6 і сильно позитивною – 7–8 балів [26].

Оцінку експресії HER-2/neu проводили згідно з рекомендаціями консенсусу американських патологів та управління з контролю за харчовими продуктами і лікарськими засобами США [27]. Позитивно пофарбованими вважали клітини з неперервним (повним) за фарбуванням оболонки клітини. Позитивний HER-2/neu статус мали препарати, що містили сильне повне забарвлення мембран більш ніж 30 % пухлинних клітин.

При проведенні статистичного дослідження використовували програму Microsoft Excel 2010 із додатком AtteStat 12.0 (визначення нормальності вибірки за критерієм Колмогорова, розрахунок незалежного критерію Стьюдента, коефіцієнта кореляції Пірсона (r) та достовірність відмінностей (p)).

Результати

Захворюваність на РМЗ у Сумській області продовжує щорічно зростати, що пов'язано з удосконаленням діагностики та поширенням цієї недуги. Так, у період із 2009 по 2012 рік число хворих збільшилося на 37 % (2009 рік – 222, 2013 р. – 305). Щодо розподілу по районах, то відносно великі показники захворюваності спостерігаються в Шосткинському, Ямпільському та Середино-Будському районах, при більш низьких показниках – у Краснопільському, Великописарівському та Тростянецькому районах (рис. 1). Так, розраховуючи на 100 тис. населення, кількість

жінок, хворих на РМЗ, у північних районах майже в два рази переважає над онкохворими у відносно екологічно чистих районах Сумської області.

Аналізуючи гістологічні варіанти РМЗ у двох групах регіонів, не виявлено ключових

відмінностей (рис. 2). Майже з однаковою частотою зустрічається інфільтруючий протоковий рак різних ступенів диференціювання за Scaff-Bloom-Richardson [28] та поодинокі випадки медулярного та РМЗ слизової залози.

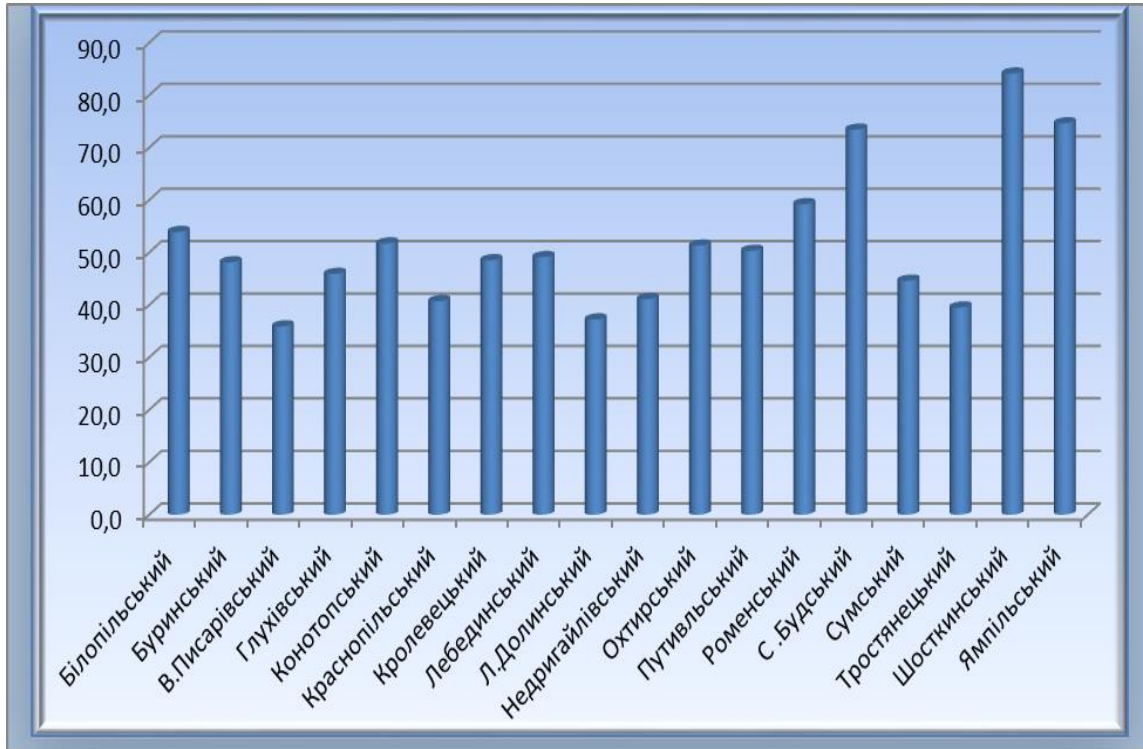


Рис. 1. Захворюваність на РМЗ у Сумській області (на 100 тис. населення)

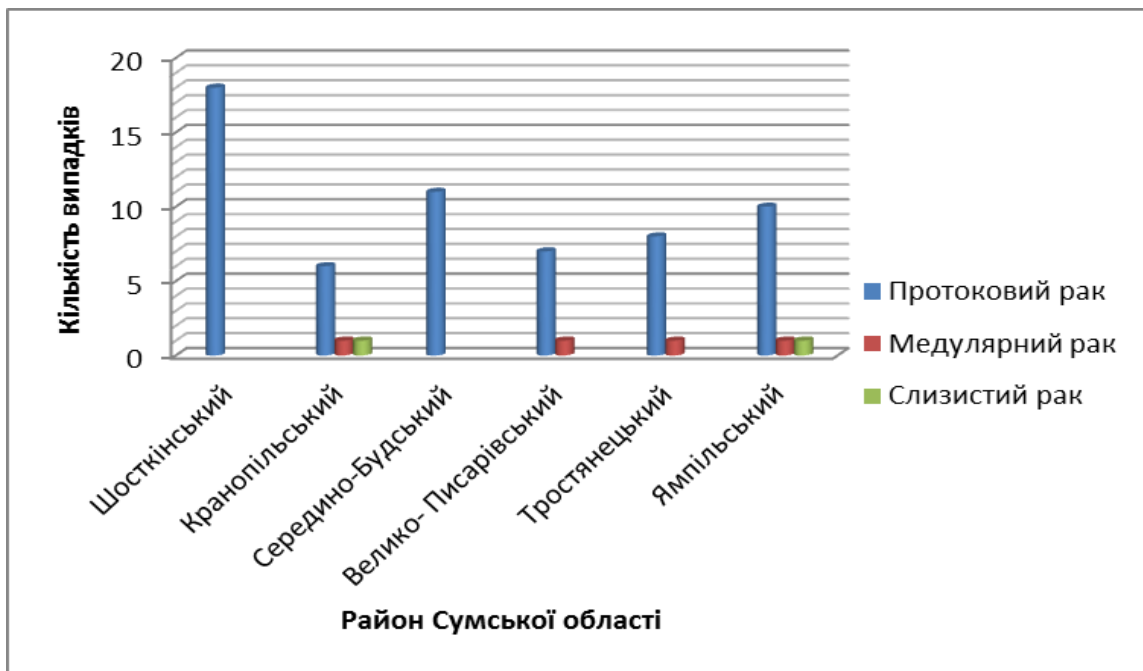


Рис. 2. Гістологічні види РМЗ у районах Сумської області

Разом із тим експресія рецепторів пухлинною тканиною була різною. У випадку дослідження ER та PR виявлялися всі 4 типи експресії рецепторів (рис. 3).

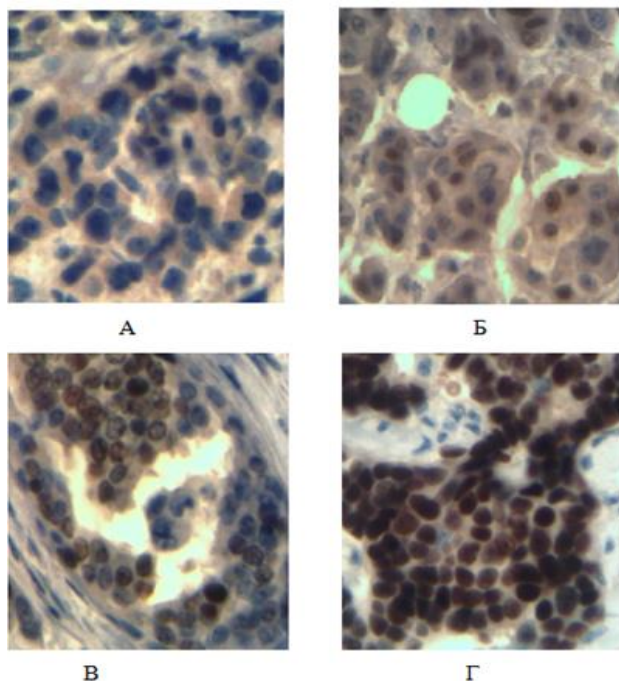


Рис. 3. Експресія рецепторів стероїдних гормонів (збільшення 400): А – негативна реакція; Б – слабо позитивна реакція; В – помірно позитивна реакція; Г – сильно позитивна реакція

Експресія HER-2/неу проявлялася в трьох варіантах: негативна реакція (0), негативна реакція (1+) та позитивна реакція (рис. 4).

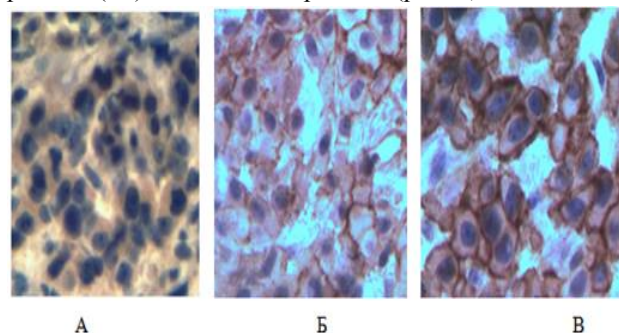


Рис. 4. Експресія рецепторів стероїдних гормонів (збільшення 400): А – негативна реакція (0); Б – негативна реакція (1+); В – позитивна реакція (3+)

Щодо особливостей експресії в окремих регіонах, то результати мають такий вигляд:

- 1) переважання експресії рецепторів до стероїдних гормонів в «екологічно чистих» регіонах ($p < 0,05$);
- 2) гіперекспресія HER-2/нео в «екологічно забруднених» регіонах ($p < 0,05$);

- 3) прямий кореляційний зв'язок між експресією ER та PR в обох групах хворих ($r + 0,78, p < 0,05$);
- 4) непрямий кореляційний зв'язок між рецепторами до стероїдних гормонів та HER-2/нео ($r - 0,73, p < 0,05$) в обох групах хворих.

Обговорення

Аналіз результатів дослідження показав, що беззаперечним залишається факт зростання захворюваності на РМЗ у Сумській області. Вбачається тенденція до переважання виявлення злоякісного онкологічного процесу в районах області, де виявлена нестабільна екологічна ситуація щодо вмісту сполук важких металів у природних ресурсах. Це можна пояснити канцерогенним впливом мікроелементів на функціонування клітини:

- іони металів-мікроелементів відіграють важливу роль в активації ферментативних реакцій за участі нуклеїнових кислот, які можуть змінювати їх структуру і порушувати процеси передачі генетичної інформації (реплікацію, транскрипцію і трансляцію), викликати одно- та двониткові розриви в дезоксирибонуклеїнових кислотах (ДНК), блокувати синтез білка та призводити до генетичних аномалій і пухлинного росту;
- приєднання іонів до фосфатних груп підвищує стабільність ДНК, у той час як зв'язування з азотистими основами знижує температуру переходу спіраль-клубок, що дестабілізує зчитування генетичного матеріалу;
- іони важких металів виступають у ролі токсичних мікроелементів (МЕ) (сюди відносять есенціальні МЕ у токсичних дозах). Їх дія полягає в ослабленні антиоксидантного захисту клітини, оскільки відбувається зв'язування іонами металів сульфгідрильних груп глутатіону та ліпоевої кислоти, тобто сполук, завдяки яким відбуваються регенерація і відновлення інших антиоксидантів в організмі. Це призводить до регулярного оксидантного стресу, якому піддаються клітини молочної залози, що також дестабілізує реалізацію генетичного матеріалу та мутагенно впливає на епітелій.

Виходячи із вищезазначеного, можна стверджувати, що канцерогенний вплив іонів важких металів реалізується як через механізми порушення структури ДНК своїм безпосереднім впливом на процеси транскрипції, трансляції та реплікації, так і через пригнічення системи антиоксидантного захисту.

Зниження експресії рецепторів до стероїдних гормонів в «екологічно забруднених» районах пояснюється мутуючим впливом МЕ на генетичний матеріал клітини та стабільним впливом «екологічних естрогенів», якими є МЕ, що виснажують можливості клітини до синтезу складових рецепторів. Зменшення експресії ER та PR призводить до збільшення резистентності пухлини до антигормональних препаратів та погіршення терапевтичного прогнозу.

Гіперекспресію HER-2/нео в «екологічно забруднених» районах можна пояснити патологічним збільшенням внутрішньоклітинного цинку, що свідчить про їхній взаємозв'язок у прогресуванні пухлинного росту [29]. Також, як вже було зазначено, метали впливають на генетичний матеріал, що підвищує експресію патологічних факторів росту, в тому числі і епідермального.

Підсумовуючи, можна зазначити, що морфогенез РМЗ в умовах забруднення довкілля важкими металами характеризується несприятливим прогнозом за рахунок гіперекспресії прогностично несприятливих та зменшення експресії терапевтично сприятливих рецепторів.

Висновки

1. Захворюваність на РМЗ в «екологічно забруднених» регіонах майже в два рази переважає над «екологічно чистими» районами Сумської області.
2. Не виявлено достовірних гістологічних відмінностей РМЗ між двома досліджуваними групами хворих.
3. Виявлена закономірність гіперекспресії епідермального фактора росту та зменшення експресії стероїдних гормонів в «екологічно-забруднених» регіонах.

Перспективи подальших досліджень

Передбачається розширення вивчення екологічної залежності перебігу РМЗ шляхом дослідження мікроелементного складу пухлин, впливу МЕ на апоптоз та проліферативний потенціал пухлин, їх участь у модифікації генетичного матеріалу.

References (список літератури)

1. Zotov AS, Belik EO. *Mastopatii i rak molochnoy zhelezzy* [Breast disease and breast cancer]. Medpress–inform Publ., 2005. 111 p.
2. Buharin DG, Velichko SA, Frolova IG. [The diagnosis of breast cancer on the background of fibrocystic disease]. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2011;2(1):14–15.
3. Hirose K, Matsuo K, Iwata H, Tajima K. Dietary patterns and the risk of breast cancer in Japanese women. *Cancer Science*. 2007;98(9):1431–1438.
4. Lissowska J, Gaudet MM, Brinton LA, Peplonska B, Sherman M, Szeszenia-Dabrowska N. Intake of fruits, and vegetables in relation to breast cancer risk by hormone receptor status. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2008;107(1):113–117.
5. Gudmundsdottir K, Ashworth A. The roles of BRCA1 and BRCA2 and associated proteins in the maintenance of genomic stability. *Oncogene*. 2006;25(2):5864–5874.
6. Neyshtadt EL, Vorobeva OA. *Patologiya molochnoy zhelezzy* [Pathology of the breast]. SPb.: Foliant Publ., 2003. 197 p.
7. Missmer SA, Eliassen AH, Barbieri RL, Hankinson SE. Endogenous estrogen, androgen, and progesterone concentrations and breast-cancer risk among postmenopausal women. *Journal of National Cancer Institute*. 2004;96(3):1856–1865.
8. Martin MB, Reiter R, Pham T, Avellanet YR. Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*. 2003;144(6):2425–2436.
9. *Dopovid pro stan navkolishnogo prirodnogo seredovischa v Sumskiy oblasti u 2009 rotsi* [Report on the state of the environment in Sumy region in 2009]. Sumy: Ellada S Publ., 2009. 84 p.
10. Mudryiy IV, Korolenko TK. [Heavy metals in the environment and their impact on organism]. *Vrachebnoe delo*. 2002;5:6–9.
11. Hankinson SE, Eliassen AH. [Endogenous estrogen, testosterone and progesterone levels in relation to breast cancer risk]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2007;106:24–30.
12. Horn-Ross PL, Hoggatt KJ, West DW, Krone MR. Recent diet and breast cancer risk: the California Teachers Study. *Cancer Causes Control*. 2002;13:407–415.
13. Hassouneh B. Tetrathiomolybdate promotes



- tumor necrosis and prevents distant metastases by suppressing angiogenesis in head and neck cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2007;6(1):1039–1045.
14. Kagara N, Tanaka N, Noguchi S, Hirano T. Zinc and its transporter ZIP10 are involved in invasive behavior of breast cancer cells. *Cancer Science*. 2007;98(5):692–697.
 15. Hashemi M, Ghavami S, Eshraghi M, Booy EP. Cytotoxic effects of intra and extracellular zinc chelation on human breast cancer cells. *European Journal of Pharmacology*. 2007;55(7):9–19.
 16. Tarutinov VI. *Molochnaya zheleza: rak i predrakovyie zabolevaniya* [Mammary gland: cancer and precancerous]. Kyiv: Poligrafist Publ., 2006. 415 p.
 17. Avtandilov GG, Perov YuL, Grigoreva SG, Zayratyants OV. [Pathohistological diagnosis of precancerous processes and breast tumors]. *Arh. Patologii*. 2001;2:26–30.
 18. Damera AO, Turkevich EA, Semiglazov VF. [Biological features of tumors in breast cancer patients younger than 35 years]. *Vopr. onkologii*. 2007;53(6):674–676.
 19. Esslimani-Sahla M. Increased estrogen receptor betax expression during mammary carcinogenesis. *Clinical Cancer Researc: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(9):3170–3174.
 20. Omoto Y, Inouse S, Ogava S, Omoto K. Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer. *Cancer Letters*. 2001;163:207–212.
 21. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*. 2005;55(2):74–108.
 22. Jackson LW, Howards PP, Wactawski-Wende J, Schisterman EF. The association between cadmium, lead and mercury blood levels and reproductive hormones among healthy, premenopausal women. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 2011;26(10):2887–2895. doi: 10.1093/humrep/der250
 23. Harris L. Update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 2007;25(33):5287–5312.
 24. Chesnokova NP, Barsukov VYu, Plohov VN. [Risk factors for breast cancer]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniia*. 2008;1:30–36.
 25. Nofech-Mozes S, Spayne J, Rakovitch E, Hanna W. Prognostic and predictive molecular markers in DCIS: a review. *Advances in Anatomic Pathology*. 2005;12:256–264.
 26. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology: an Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 1998;11:155–168.
 27. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN; American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists. Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:118–145.
 28. Amat S, Penault-Llorca F, Cure H. Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading: a pleiotropic marker of chemosensitivity in invasive ductal breast carcinomas treated by neoadjuvant chemotherapy. *International Journal of Oncology*. 2002;20(4):791–796.
 29. Taylor KM, Vichova P, Jordan N, Hiscox S. ZIP7-mediated intracellular zinc transport contributes to aberrant growth factor signaling in antihormone-resistant breast cancer cells. *Endocrinology*. 2008;149:4912–4920.
- (received 28.04.2014, published online 05.07.2014)
- (отримано 28.04.2014, опубліковано 05.07.2014)

