

**Abstract****Romaniuk A., Lyndin M. \*****Karpenko L., Budko A.,****<sup>1</sup>Lyndina Yu., Logvinova O.***Sumy State University,**2, Rymskogo-Korsakova St., Sumy,*  
*40007, Ukraine**<sup>1</sup>CI «Center for Primary Health**Care № 3 Sumy»,**48/50, Illinskaya st., Sumy, 40009,*  
*Ukraine***THE INFLUENCE OF INFLAMMATORY INFILTRATION ON HSP90 $\alpha$  RECEPTOR EXPRESSION IN BREAST CANCER TISSUES**

The passing of breast cancer (BC) is dependent on many factors. Presence of inflammatory infiltration in the stroma and its qualitative composition play one of the key roles. Information about its influence is contradictory. On the one hand the reduction of leukocyte infiltration increases the incidence of damage lymph nodes; on the other hand immune microenvironment of tumor determines the proliferative activity, migration and metastasis of cells. Heat shock proteins or chaperones are a family of highly conserved intracellular proteins. They are constantly synthesized in normal conditions, but under the stress the synthesis significantly is increased. The influence of inflammation and oxidase stress leads to the synthesis of HSP. Hsp90 is responsible for the conformational maturation and repair of more than 300 intracellular proteins that play an important role in the growth, differentiation and maturation of cells. It is known the influence of chaperone 90 on the stability steroid receptors.

Objective of the investigation was the study of Hsp90 synthesis in the presence of inflammatory infiltration in the intercellular neoplastic space and the possibility of its influence on the malignant process.

We selected 43 cases of infiltrative ductal carcinoma of different degree of malignancy by Scarff-Bloom-Richardson. The material was divided into two groups. The first group included 24 cases of breast cancer with the presence of leukocyte infiltration in tumor stromal component, the second - 19 cases without inflammatory infiltration in the stroma. Immunohistochemical reaction took place in 2 stages: I – incubated with primary rabbit antibody at a dilution of 1:200; II - incubation with secondary antibodies (UltraVision ONE HRP Polymer). Mathematical calculations were done using Microsoft Excel 2010 with AtteStat 12.0.5 option.

The presence of inflammatory infiltration in the stromal component of the tumor tissue does not depend on the degree of malignancy of tumor ( $p>0.05$ ). It was established a correlation between the level of expression chaperones in the epitheliocytes and infiltration of stromal breast cancer tissue ( $p<0.05$ ). Immune microenvironment stimulates the synthesis in epithelial cells Hsp90 $\alpha$ , which may increase their protective properties against the action pharmaceutical preparations and the influence of the macroorganism.

**Key words:** chaperones, breast cancer, inflammatory infiltration..

**Corresponding author:** \* lyndin\_nikolay@ukr.net

**Резюме**

**Романюк А.М., Линдін М.С., Карпенко Л.І., Будко А.Ю.,<sup>1</sup>Линдіна Ю.М., Логвінова О.В.**  
Сумський державний університет,  
вул. Римського-Корсакова, 2,  
Суми, 40007, Україна  
<sup>1</sup>Комунальна установа «Центр первинної медико-санітарної допомоги №3 м. Суми»,  
вул. Іллінська, 48/50, м. Суми,  
40009, Україна

**ВПЛИВ ЗАПАЛЬНОЇ ІНФІЛЬТРАЦІЇ НА ЕКСПРЕСІЮ РЕЦЕПТОРІВ HSP90α В ТКАНИНІ РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

Метою дослідження стало визначення інтенсивності експресії рецепторів Hsp90α в тканині раку молочної залози, враховуючи якісний склад стромального компонента та кількісний склад запального інфільтрату. Для дослідження використано 43 зразки пухлинної тканини молочної залози з та без запальної інфільтрації строми. Проведено імуногістохімічне дослідження з метою визначення рівня експресії ядерно-цитоплазматичного рецептора Hsp90α. При гістологічному дослідженні встановлено, що клітини імунної системи розташовуються у різних варіаціях: інтерстиційно, трабекулярно, вогнищево (нодулярно), дифузно та у змішаному варіантах. Наявність запальної інфільтрації в стромальному компоненті пухлинної тканини не залежить від ступеню злоякісності пухлинного процесу ( $p > 0,05$ ). Встановлено кореляційний зв'язок між рівнем експресії шаперону в епітеліоцитах та запальною інфільтрацією строми тканини раку молочної залози ( $p < 0,05$ ).

**Ключові слова:** шаперони, рак молочної залози, запальна інфільтрація.

**Резюме**

**Романюк А.Н., Линдин Н.С. \*, Карпенко Л.И., Будко А.Ю., Линдина Ю.Н.<sup>1</sup>, Логвинова Е.В.**  
Сумский государственный университет,  
ул. Римского-Корсакова, 2,  
Сумы, 40007, Украина  
<sup>1</sup>ГУ «Центр первичной медико-санитарной помощи №3 г. Сумы»,  
ул. Иллинская, 48/50, г. Сумы,  
40009, Украина

**ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ ИНФИЛЬТРАЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ РЕЦЕПТОРОВ HSP90α В ТКАНИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

Целью исследования стало определение интенсивности экспрессии рецепторов Hsp90α в ткани рака молочной железы, учитывая качественный состав стромального компонента и количественный состав воспалительного инфильтрата. В исследовании использованы 43 образца опухолевой ткани молочной железы с и без воспалительной инфильтрации строми. Проведено иммуногистохимическое исследование с целью определения уровня экспрессии ядерно-цитоплазматического рецептора Hsp90α. При гистологическом исследовании выявлено, что клетки иммунной системы располагаются в различных вариациях: интерстициально, трабекулярно, очагово (нодулярно), диффузно и в смешанном вариантах. Наличие воспалительной инфильтрации в стромальном компоненте опухолевой ткани не зависит от степени злокачественности опухолевого процесса ( $p > 0,05$ ). Установлена корреляционная связь между уровнем экспрессии шаперона в опухолевых эпителиоцитах и инфильтрацией строми ткани рака молочной железы ( $p < 0,05$ ).

**Ключевые слова:** шапероны, рак молочной железы, воспалительная инфильтрация.

**Автор, відповідальний за листування:** \* lyndin\_nikolay@ukr.net

**Вступ**

Перебіг раку молочної залози (PMЗ) залежить від багатьох факторів. Серед них важливу роль відіграють тип пухлинного процесу, вік жінок, супутні захворювання, рецепторний фенотип клітин та інші. Наявність запальної інфільтрації у стромальному компоненті пухлини та

її якісний склад займають не останнє місце в канцерогенезі [1]. Відомості про її вплив суперечливі. Дослідження взаємозв'язку імунної реакції зі ступенем поширеності PMЗ показали, що зі зменшенням рівня лейкоцитарної інфільтрації (CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD37, CD38, CD163) навколо пухлини збільшується



частота ураження регіонарних лімфатичних вузлів. Цей факт пояснюється участю клітин імунної системи в оточенні пухлини та обмеженні подальшого її поширення [2]. Іншою точкою зору є стимулюючий вплив інфільтрату на прогрес канцерогенезу. Показано, що імунне мікрооточення пухлини визначає проліферативну активність, міграцію та метастазування клітин. Цей процес здійснюється як завдяки здатності клітин сприймати сигнальні молекули типу прозапальних цитокінів, селектинів, хемокінів, джерелом яких є клітини запалення, так і самостійно їх секретувати [3].

Білки теплового шоку або шаперони (БТШ, heat shock proteins - hsp) відносяться до сімейства висококонсервативних внутрішньоклітинних білків. Відомо кілька груп шаперонів, об'єднаних в сімейства залежно від їх молекулярної маси: HSPH (Hsp110), HSPC (Hsp90), HSPA (Hsp70), DNAJ (Hsp40), сімейство малих HSPB (sHSP м.м. 25/27 кДа, 22 и 20 кДа), а також сімейство шаперонинів HSPD/E (HSP60/HSP10) [4]. Вони постійно синтезуються в нормальних умовах, але під час стресу їх синтез значно зростає.

Hsp90 відповідає за конформаційне дозрівання і репарацію більше 300 внутрішньоклітинних білків, які відіграють важливу роль у рості, диференціюванні та дозріванні клітин. З них більше 40 складають білки, що сприяють включенню клітин у проліферативний цикл: ErbB2/HER2, Braf, Akt/PKB, мутантний p53, транскрипційні фактори, ангиогенний фактор HIF-1 $\alpha$ , теломераза і т.д [5-7]. Hsp90 сприяє активації антиапоптотичних протеїнази та блокує ARAF-1 білок внутрішнього шляху апоптозу, тим самим підтримує стійкість клітин перед розвитком їх запрограмованої загибелі [6]. Доведено вплив шаперону 90 на стабільність рецепторів до стероїдних гормонів, що також можна розглядати як прогностично несприятливий вплив на канцерогенез молочної залози [8]. Нещодавно з'явилися дані про участь hsp90 у стабілізації рецепторів епідермального фактору росту, який є прогностично-несприятливим маркером РМЗ [9]. Hsp90 $\alpha$  діє як шаперон матричної металопротеїнази-2, яка володіє колагеназною активністю, приводячи до підвищення інвазивності пухлини.

У багатьох дослідженнях показано явище перехресної стійкості, при якому одні пошкодуючі агенти (підвищення температури, додавання до клітин органічних розчинників, важких

металів, сильних оксидантів, а також вплив деяких гормонів і ростових факторів) викликають індукцію синтезу Hsp та адаптивну відповідь на інші фактори. Отже, вплив запалення та постійно виникаючого при ньому оксидативного стресу призводять до синтезу клітинами шаперонів. У результаті цього вони своїми побічними ефектами можуть призводити до прогресування іншого захворювання [10].

Враховуючи вищезазначене, відкритим залишається питання синтезу Hsp90 при умовах наявності запальної інфільтрації в міжклітинному пухлинному просторі та можливість його впливу на перебіг злоякісного процесу. Тому метою нашого дослідження стало визначення інтенсивності експресії рецепторів Hsp90 $\alpha$  в тканині раку молочної залози, враховуючи якісний склад стромального компоненту та кількісний склад запального інфільтрату.

Дана робота виконана в межах навчально-дослідницької теми «Морфогенез загальнопатологічних процесів», № держ. реєстрації 013U003315.

#### Матеріали та методи дослідження

Для дослідження використано 43 зразки пухлинної тканини молочної залози. Матеріал після фіксації у формаліну, проводки, заливки у парафін та виготовлення зрізів підлягав стандартному фарбуванню гематоксилін-еозином. У всіх використаних випадках був встановлений діагноз інфільтративного протокового РМЗ. Матеріал був розподілений на дві групи. У першу групу увійшли 24 зразки РМЗ з наявністю лейкоцитарної інфільтрації в стромальному компоненті пухлини, у другу – 19 зразків без запальної інфільтрації строми.

З парафінових блоків для імуногістохімічного дослідження виготовлялися зрізи завтовшки 3-4 мкм. Реакція проходила в два етапи: 1 - інкубування з первинними кролячими поліклональними антитілами до Hsp90 $\alpha$  (також відомого як Hsp86) в розведенні 1:200, 2 - інкубування з вторинними антитілами (UltraVision ONE HRP Polymer). Візуалізували фермент в складі вторинних антитіл за допомогою діамінобензидину, який фарбував складові клітин у коричневий колір.

Рівень експресії ядерно-цитоплазматичного рецептора Hsp90 $\alpha$  оцінювали напівкількісним методом з урахуванням частки забарвлених клітин та інтенсивності їх забарвлення: 0 балів – відсутність реакції, 1 бал – слабка реакція, 2



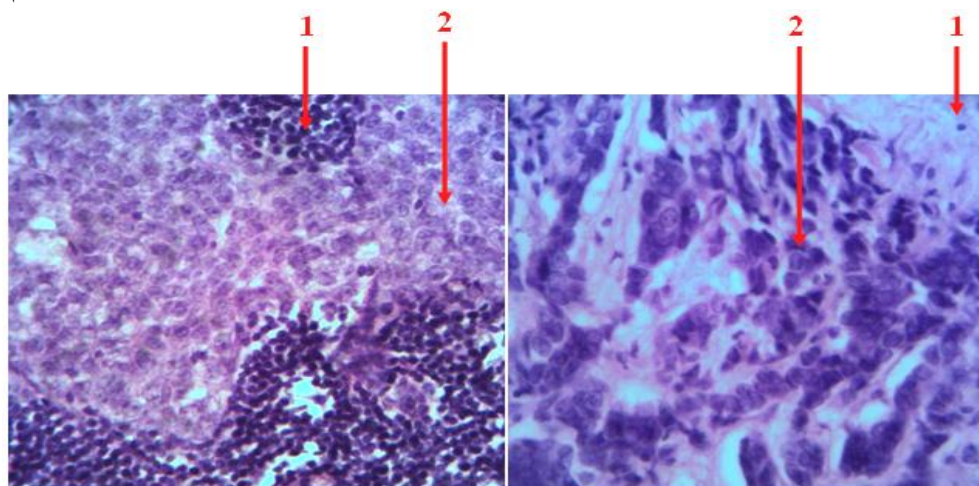
бали – помірна реакція, 3 бали – виражена реакція.

Математичні розрахунки були проведені за допомогою програми Microsoft Excel 2010 з додатком AtteStat 12.0.5. (визначення нормальності вибірки критерієм  $\chi^2$  Пірсона, розрахунок незалежного t-критерію Ст'юдента, коефіцієнту кореляції Пірсона ( $r$ ), при статистичній значимості  $p < 0,05$ ).

#### Результати досліджень та їх обговорення

При гістологічному дослідженні встановлено, що у зразках першої групи навколо пухлини клітини імунної системи розташовуються у різних варіаціях:

- інтерстиційно - у вигляді поодинокорозкиданих клітин;
- трабекулярно – клітини розташовуються у вигляді ліній, тяжів та трабекул;
- вогнищево (нодулярно) – у вигляді утворень округлої форми, інколи з формуванням псевдофолікулів;
- дифузно – займає майже всю міжклітинну площу, створюючи враження метастазу у лімфатичному вузлі (Рисунок 1А).
- змішано – комбінація різних видів інфільтрації.



**Рис. 1** Гістологічна картина раку молочної залози 1 – клітини інфільтрату, 2 – пухлинні клітини. Зabarвлення: гематоксилін-еозин. Зб. \*400

У стромі пухлинної тканини другої групи також були присутні клітини імунної системи, тому як вони є складовою частиною фіброзної тканини будь-якого органу, в т.ч. і молочної залози (Рисунок 1Б). Але вони розташовувались поодинокі та на більший відстані одна від одної ніж у інтерстиційному варіанті інфільтрації пухлини.

Хоча чіткої залежності між ступенем злоякісності інфільтративного протокового РМЗ за Scarff-Bloom-Richardson та видом запального інфільтрату виявлено не було ( $p > 0,05$ ), але відмічалася тенденція до посилення інфільтрації за умов зростання поліморфізму «ракових» клітин. Це говорить про більш виражену реакцію макроорганізму зі зростанням анаплазії пухлинних епітеліоцитів.

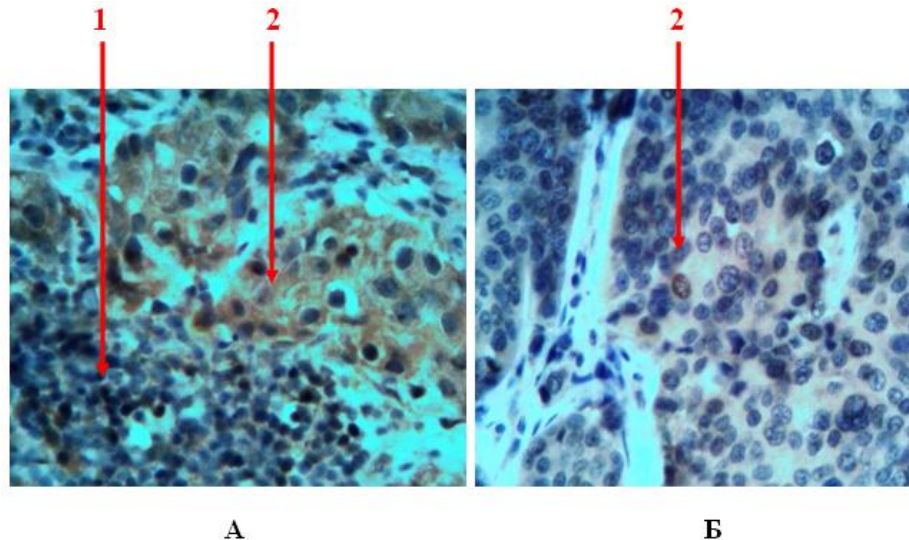
У результаті проведеного імуногістохімічного дослідження було виявлено, що вміст шаперону Hsp90 $\alpha$  в пухлинних клітинах характеризується цитоплазматичною та ядерною локалізацією.

Причому ядерна локалізація зустрічається рідше. Результати виявилися наступними: майже 80% пухлин молочної залози були позитивними щодо експресії Hsp90 $\alpha$ , що говорить про участь цього білка в пухлинному розвитку. Клітини першої групи тканин (Рисунок 2А) мали більш виразне фарбування в порівнянні з другою групою (Рисунок 2Б). Встановлено кореляційний зв'язок між рівнем експресії шаперону в пухлинних епітеліоцитах та інфільтрацією стромі тканини РМЗ ( $p < 0,05$ ).

Враховуючи дані нашого дослідження, можна припустити, що накопичення клітин імунної системи навколо «ракових» клітин призводить до виділення ними біологічно-активних речовин. Останні сприяють міжклітинній взаємодії та змінюють фізико-хімічні властивості міжклітинного простору. У підсумку це призводить до захисної реакції клітин у вигляді синтезу БТШ, в тому числі і Hsp90 $\alpha$ . Hsp90 $\alpha$ , виконуючи свої функції стосовно захисту клітин, призводить до

підвищення стійкості їх до впливу інших факторів (наприклад фармацевтичних препаратів). У підсумку Hsp90 $\alpha$  починає приймати участь у життєдіяльності пухлини (виробленні сигналів росту, підвищенні чутливості до інгібуючих

факторів, ухиленні від апоптозу, спроможності до необмеженої кількості реплікацій, підтримці ангиогенезу, метастазуванні [11]), тобто посилює агресивність злоякісного процесу.



**Рис. 2** Імуногістохімічна реакція по визначенню Hsp90 $\alpha$   
1 – клітини інфільтрату, 2 – пухлинні клітини. Зб. \*400

Узагальнюючи вищезазначене, можна припустити, що запальна інфільтрація підвищує стійкість «ракових» клітин у процесі виживання і боротьбі з макроорганізмом, а наявність експресії рецепторів Hsp90 $\alpha$  в пухлинних клітинах тільки підтверджує зростання агресивності РМЗ. Ті впливи імунної системи, що мали б знищувати клітини раку, натомість стимулюють останні

до придбання нових функцій, що негативно відображається на процесі канцерогенезу. Це необхідно враховувати при призначенні лікування, бо вже на сьогодні є ряд фармацевтичних препаратів, які призводять до загибелі «ракових» клітин і затримці росту пухлини, вибірково викликаючи функції БТШ [12].

### Висновки

1. Наявність запальної інфільтрації в стромальному компоненті пухлинної тканини не залежить від ступеню злоякісності пухлинного процесу ( $p > 0,05$ ), але відмічається тенденція до посилення інфільтрації за умов зростання поліморфізму «ракових» клітин.

2. Встановлено кореляційний зв'язок між рівнем експресії шаперону 90 $\alpha$  в «ракових» клітинах та інфільтрацією строми тканини раку молочної залози ( $p < 0,05$ ).

### References (список літератури)

1. Perelmuter VM, Odintsov YuN. [Features inflammatory infiltration in the stroma of invasive ductal breast cancer in the development of recurrence]. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal*. 2010;5(41):11-16.

3. Імунне мікрооточення стимулює синтез пухлинними епітеліоцитами Hsp90 $\alpha$ , що може підвищувати їх стійкість до дії фармацевтичних препаратів та впливу макроорганізму.

### Перспективи подальших досліджень

В майбутньому передбачається розкриття питання щодо причини виникнення запальної інфільтрації, вивчення якісного складу пухлинного мікрооточення та вплив останнього на рецепторний апарат клітини, спостереження за прогностичним значенням Hsp90 $\alpha$  в перебігу раку молочної залози.

2. Domschke C, Schuetz F, Ge Y. Intratumoral cytokines and tumor cell biology determine spontaneous breast cancer-specific immune responses and their correlation to prognosis. *Cancer Res*. 2009;69(21):8420–8428.

3. Keibel A, Singh V, Sharma MC. Inflammation, microenvironment, and the immune system in

- cancer progression. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15(17):1949–1955.
4. Kampinga HH, Hageman J, Vos MJ. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperones.* 2009;14(1):105–11.
  5. Grbovic OM, Basso AD, Sawai A. V600E B-Raf requires the Hsp90 chaperone for stability and is degraded in response to Hsp90 inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103(1):57–62.
  6. Grad I, Picard D. The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Mol Cell Endocrin.* 2007;275(1–2):2–12.
  7. Picard D. Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrin Metab.* 2006;17(6):229–35.
  8. Zagouri F, Bournakis E, Koutsoukos K. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Expression and Breast Cancer. *Pharmaceuticals.* 2012;5:1008-1020.
  9. Berezowska S, Novotny A, Bauer K, Feuchtinger A, Slotta-Huspenina J, Becker K, Langer R, Walch A. Association between HSP90 and Her2 in Gastric and Gastroesophageal Carcinomas. *PLoS One.* 2013;8(7):37-45.
  10. Kregel K.C. Ileal shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance / K.C. Kregel // *J. Appl. Physiol.* - 2002. - Vol.92(5). - P.2177-2186.
  11. Schmitt E, Gehrmann M, Brunet M. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J.leukoc.Biol.* 2007;81(1):15-27.
  12. Shevtsov MA, Hachatryan VA, Margulis BA. [The use of heat shock proteins in clinical oncologists]. *Sovremennaya onkologiya.* 2012;1:63-68.

*(received 15.01.2015, published online 30.03.2015)*

*(отримано 15.01.2015, опубліковано 30.03.2015)*

