

# АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ СЕМЕЙСТВ *ABC*, *GST* С ОТВЕТОМ ОПУХОЛИ НА ЦИТОСТАТИЧЕСКУЮ ТЕРАПИЮ У ПАЦИЕНТОК С ОТЕЧНО-ИНФИЛЬТРАТИВНЫМ И ПЕРВИЧНО-ДИССЕМИНИРОВАННЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Третьяк И.Ю., Демидчик Ю.Е., Костюк С.А.

Государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», Минск, Республика Беларусь

**Реферат.** Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний, важным компонентом лечения которого является системная химиотерапия. При этом наиболее частые механизмы формирования устойчивости к цитостатической терапии взаимосвязаны с изменением экспрессии глутатион-S-трансфераз (*GST*) и белков семейства *ABC*-транспортёров. В статье освещен вопрос оценки риска прогрессирования опухолевого процесса на фоне полихимиотерапии с включением антрациклинов, на основании определения экспрессии генов семейств *ABC*, *GST* у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы

**Ключевые слова:** первично-диссеминированный, отечно-инфильтративный рак молочной железы, *ABC*-транспортёры, глутатион-S-трансферазы.

**Введение.** Рак молочной железы является актуальной медико-социальной проблемой в большинстве стран мира. К сожалению, до сих пор РМЖ достаточно часто выявляется в запущенной стадии. Так, в Республике Беларусь в 2014 г. III стадия заболевания установлена у 18,7%, IV стадия — у 6,7% из вновь выявленных пациенток [1]. Согласно классификации TNM, первичные карциномы молочной железы с распространением на кожу классифицируются как T4. В отечественной литературе карциномы T4 также называют отечно-инфильтративной формой рака молочной железы [2]. Таким образом, под отечно-инфильтративной формой рака молочной железы понимают варианты местно-распространенного рака, сопровождающиеся отеком и/или гиперемией кожи молочной железы [2]. Первично-диссеминированный рак молочной железы представляет собой опухолевый процесс с наличием отдаленных метастазов (IV стадия рака молочной железы). Согласно современным представлениям при раке молочной железы требуется использование программы комплексного лечения с включением системной химиотерапии. Согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 258 от 11.03.2012 об утверждении клинических протоколов «Алгоритмы диагностики и лечения злокачественных новообразований», в первой линии полихимиотерапии обычно применяют антрациклинсодержащие схемы. В связи с этим изучение молекулярных механизмов, вовлеченных в развитие резистентности к цитостатической терапии, в частности с включением антрациклинов, является важным и перспективным в лечении РМЖ. При этом особый интерес в определении внутривидовых различий в реакциях на противоопухолевое лечение представляют глутатион-S-трансферазы (*GST*) и белки семейства *ABC*-транспортёров. Полагается, что *GST* участвуют в развитии лекарственной устойчивости с помощью прямого детоксифицирующего действия, а также как ингибитор MAP-киназного пути (митоген активированные белки) [3]. *ABC* белки (ATP Binding Cassette transporters, АТФ-зависимые транспортёры) принимают участие в формировании лекарственной устойчивости опухолевых клеток путем активация выброса противоопухолевых лекарственных средств из клетки [4]. Таким образом, выбор направления исследования обусловлен необходимостью изучения и понимания молекулярных механизмов, способствующих лекарственной устойчивости, оказывающих влияние на течение опухолевого процесса.

**Цель работы** — повышение эффективности оценки ответа опухоли к цитостатической терапии на основании определения экспрессии генов семейств *ABC*, *GST* у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы

**Материалы и методы.** Определение экспрессии генов семейств *ABC*, *GST* выполнено у 37 пациенток с установленным в 2009–2013 гг. диагнозом «рак молочной железы с T4N любая M0», у 61 пациентки с установленным в 2009 г. — 1 полугодии 2014 г. диагнозом «рак молочной железы IV стадии», которым назначали цитостатическую терапию с включением антрациклинов на 1-м этапе специального лечения.

В качестве материала для исследования использовали парафин-фиксированные срезы образцов опухолевой ткани пациенток. Определение экспрессии генов семейств *ABC*, *GST* производилось путем оценки количества матричной РНК (мРНК) методом обратнo-транскрипционной ПЦР (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. В качестве референсного гена выбран ген *HGUS* (human  $\beta$ -glucuronidase) из числа «генов домашнего хозяйства» (housekeeping genes), которые являются однокопийными и экспрессируются во всех клетках человека. Полученную в результате обратной транскрипции кДНК применяли для постановки TaqMan ПЦР в режиме реального времени с участием специально подобранных пар праймеров и зондов для целевых генов и референсного house-keeping гена *HGUS*.

Расчет процента уровня нормализованной экспрессии генов проводился по формуле:

$$2^{-(Ct \text{ интересующего гена образца} - Ct \text{ гена } HGUS \text{ образца})} \times 100\%,$$

где *Ct* — пороговый цикл (cycle threshold).

Для описания количественных переменных в случае распределения, отличного от нормального, вычисляли медиану и размах (Me (min...max)). Качественные переменные представлены в виде абсолютных чисел и от-

носительных частот. Статистический анализ групп проводился следующим образом: для категориальных признаков — с помощью критерия Х2-Пирсона. Сравнительный анализ количественных показателей в двух группах проводился с помощью критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Из-за возможного влияния конфаундеров результаты однофакторного анализа могут быть смещены, соответственно для уточнения истинных эффектов использовали более либеральные критерии исключения при многофакторном анализе, в частности  $p > 0,3$  [5]. Многофакторный анализ для сравнения двух групп осуществлялся с помощью логистической регрессии: для каждой переменной отклика строилась предварительная модель на множестве исследуемых показателей, которая затем редуцировалась с помощью алгоритма пошагового исключения (backward stepwise) на основе информационного критерия ВИС. После получения окончательной модели рассчитывалось отношение шансов и доверительные интервалы путем экспоненцирования соответствующего коэффициента регрессии и его доверительного интервала для каждого показателя из окончательной модели. Вычисления выполнены в пакете R; версия R 3.1.1.

В связи высоким процентом отсутствия экспрессии генов *GSTM1* (63,3%) и *ABCG2* (43,9%) у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным раком молочной железы при статистической обработке данные гены рассматривались как номинальные.

**Результаты и их обсуждение.** Анализ взаимосвязи экспрессии генов семейств *ABC*, *GST* с ответом опухоли на химиотерапию с включением антрациклинов проведен у 61 пациентки с первично-диссеминированным раком молочной железы и у 37 пациенток с отечно-инфильтративной формой РМЖ. Следует отметить, что выявлена достоверная ассоциация степени распространенности опухолевого процесса (первично-диссеминированный против отечно-инфильтративного) и ответа опухоли на цитостатическую терапию с включением антрациклинов — риск прогрессирования был статистически значимо выше у пациенток с IV стадией РМЖ ( $p < 0,001$ ).

Далее анализировали влияние характеристик опухолевого процесса на ответ опухоли на цитостатическую терапию с включением антрациклинов. Эффективность химиотерапии оценивали по критериям RECIST 1,1. Ответы опухоли на специальное лечение были разделены на 2 группы: полный или частичный ответ, или стабилизация (достижение контроля над опухолью) против прогрессирования. У пациенток с первично-диссеминированным и отечно-инфильтративным раком молочной железы не установлено взаимосвязи отсутствия контроля над опухолью с гормон-рецепторным статусом, молекулярно-генетическими подтипами, степенью злокачественности опухоли ( $p > 0,05$ ) (таблица 1).

Таблица 1. — Ассоциация характеристик опухолевого процесса пациенток с первично-диссеминированным и отечно-инфильтративным раком молочной железы с ответом опухоли на полихимиотерапию

Характеристики опухолевого процесса	Отсутствие контроля над опухолью (прогрессирование)	
	первично-диссеминированный рак молочной железы	отечно-инфильтративный рак молочной железы
	p	p
Молекулярно-генетический подтип опухоли	0,769	0,149
Гистологическая степень злокачественности (Nottingham)	0,99	0,632
Эстроген-рецепторный статус опухоли	0,936	0,461
Прогестерон-рецепторный статус опухоли	0,348	>0,99

На 2-м этапе исследования анализировали взаимосвязи экспрессии генов *ABC*, *GST* с ответом опухоли на цитостатическую терапию с включением антрациклинов у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным РМЖ. В результате однофакторного анализа (таблица 2) можно сделать вывод, что вероятность прогрессирования при цитостатической терапии выше при отсутствии экспрессии гена *GSTM1* ( $p = 0,092$ ). Для других генов семейства *GST*, а также для генов семейства *ABC* не выявлено влияния экспрессии на достижение контроля над опухолью при химиотерапии.

При многофакторном анализе вероятность прогрессирования (отсутствия достижения контроля над опухолью) при полихимиотерапии с включением антрациклинов у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным РМЖ возрастала с увеличением экспрессии гена *ABCC5* (ОШ 1,1 (95% ДИ 1,04–1,3),  $p = 0,009$ ), при отсутствии экспрессии гена *GSTM1* (ОШ 3,8 (95% ДИ 1,2–13,1),  $p = 0,026$ ), экспрессии гена *GSTT1* менее 25% (ОШ 5,4 (95% ДИ 1,6–22,9),  $p = 0,012$ ), а также при наличии диссеминированного опухолевого процесса (M1) (ОШ 17,4 (95% ДИ 4,0–124,1),  $p < 0,001$ ) (таблица 3). Чувствительность модели — 0,92 (95% ДИ 0,81–1,00), специфичность — 0,58 (95% ДИ 0,46–0,69), эффективность — 0,67 (0,57–0,76). Произведена внутренняя валидизация модели методом бутстрэп.

Таблица 2. — Ассоциация экспрессии *ABC*, *GST* с достижением контроля над опухолью при цитостатической терапии с включением антрациклинов

Ген	Полный + частичный ответ + стабилизация, n = 72	Прогрессирование, n = 26	p
<i>ABCC2</i>	0 (0...18,2)	0,1 (0...1,6)	0,400
<i>ABCC5</i>	1,8 (0...28,7)	2,1 (0,1...35,4)	0,272
<i>ABCA12</i>	2,5 (0...263,9)	1,9 (0,1...34,4)	0,372
<i>ABCC1</i>	4,3 (0...59)	3,4 (0,3...17,1)	0,143
<i>ABCG2</i> >0, n (%)	39 (54%)	16 (62%)	0,516
<i>GSTP1</i>	114,5 (9,6...1956,2)	113,4 (13,4...1611,1)	0,612
<i>GSTM1</i> >0, n (%)	30 (48%)	6 (23%)	<b>0,092</b>
<i>GSTT1</i>	16,6 (0...417)	14,4 (0...114,1)	0,187

Таблица 3. — Многофакторный анализ ассоциации экспрессии *ABC*, *GST* с вероятностью прогрессирования при химиотерапии с включением антрациклинов

Переменная	b	ОШ (95% ДИ ОШ)	p
<i>ABCC5</i>	0,1	1,1 (1,04–1,3)	0,009
<i>GSTM1</i> =0	1,3	3,8 (1,2–13,1)	0,026
<i>GSTT1</i> <25%	1,7	5,4 (1,6–22,9)	0,012
Первично-диссеминированный против отечно-инфильтративного РМЖ	2,9	17,4 (4,0–124,1)	<0,001

С использованием полученных данных построена номограмма, предсказывающая вероятность прогрессирования опухолевого процесса при полихимиотерапии с включением антрациклинов на основании определения экспрессии генов *ABCC5*, *GSTM1*, *GSTT1* с учетом стадии опухолевого процесса (рисунок)

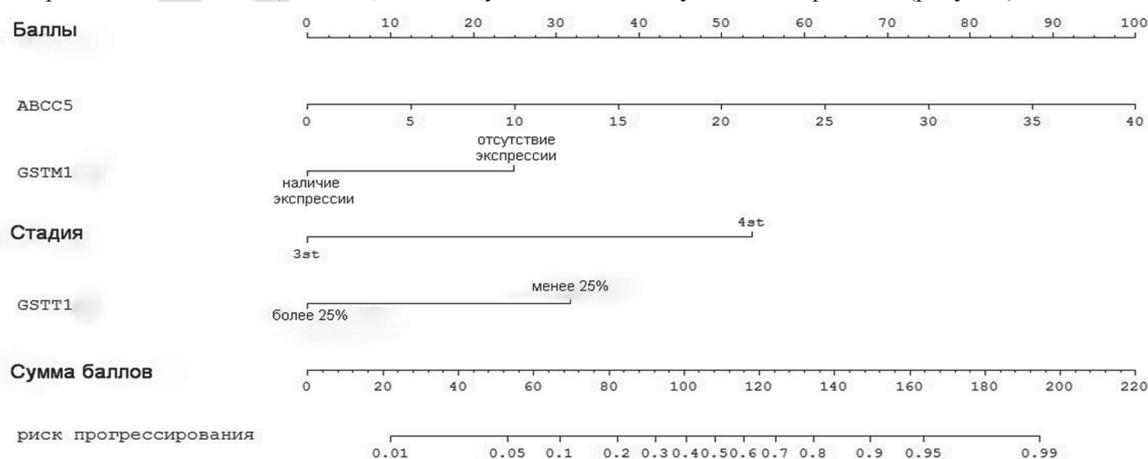


Рисунок — Номограмма, предсказывающая вероятность прогрессирования опухолевого процесса при полихимиотерапии с включением антрациклинов на основании определения экспрессии генов *ABCC5*, *GSTM1*, *GSTT1* с учетом стадии опухолевого процесса

При использовании номограммы результат достигается следующим образом:

- на основании полученных результатов об уровне экспрессии гена *ABCC5* производится отметка на оси «*ABCC5*», из данной точки возводится перпендикуляр, в месте пересечения которого с осью «Баллы» определяется соответствующее количество баллов;
- с использованием данных о наличии/отсутствии экспрессии гена *GSTM1* производится отметка на оси «*GSTM1*», из которой возводится перпендикуляр, в месте пересечения с осью «Баллы» определяется соответствующее количество баллов;
- на основании полученных результатов об уровне экспрессии гена *GSTT1* (>25%, ≤25%) производится отметка на оси «*GSTT1*», из данной точки возводится перпендикуляр, в месте пересечения которого с осью «Баллы» определяется соответствующее количество баллов;

- с учетом данных о степени распространенности опухолевого процесса (отечно-инфильтративная форма РМЖ — III стадия или IV стадия заболевания) также производится отметка на оси «Стадия», из которой возводится перпендикуляр и в месте пересечения с осью «Баллы» определяется соответствующее количество баллов;

- полученные баллы суммируются. На строке «Сумма баллов» отмечается полученное значение и из данной точки опускается перпендикуляр, в месте пересечения которого с осью «риск прогрессирования» определяется вероятность прогрессирования опухолевого процесса при полихимиотерапии с включением антрациклинов.

Полученные данные о влиянии экспрессии гена *ABCC5* на ответ опухоли на неoadъювантную полихимиотерапию с включением антрациклинов согласуются с результатами исследования Park et al. [66], в котором отмечено наличие связи между экспрессией *ABCC5*, *ABCA12*, *ABCA1*, *ABCC13*, *ABCB6*, *ABCC11* и более низким эффектом неoadъювантной химиотерапии у пациенток с РМЖ ( $p < 0,05$ ).

В нашем исследовании впервые выявлена взаимосвязь между отсутствием экспрессии гена *GSTM1*, низкой экспрессией гена *GSTT1* и риском прогрессирования при ПХТ с включением антрациклинов у пациенток, страдающих РМЖ. Точный молекулярный механизм, объясняющий данное явление, остается неясным. Можно было ожидать, что отсутствие экспрессии *GST*, а соответственно снижение ферментативной деятельности, приведет к лучшему ответу на химиотерапию. Однако имеется ряд сообщений, что при нулевых генотипах *GSTT1/GSTM1* отмечен худший ответ на химиотерапию при различных локализациях неопластического процесса [7]. Имеется гипотеза, что сниженная активность *GST* и, следовательно, меньшее потребление глутатиона в *GST*-катализируемых реакциях приводят к более высокому уровню глутатиона, который блокирует апоптоз и способствует пролиферации опухолевых клеток [8].

**Заключение.** Таким образом, в ходе исследования установлено, что у пациенток с отечно-инфильтративным и первично-диссеминированным РМЖ уровни экспрессии генов *ABCC5*, *GSTM1*, *GSTT1* ассоциированы с чувствительностью опухоли к антрациклинам ( $p < 0,05$ ). Разработанная номограмма, предсказывающая вероятность чувствительности опухоли к химиотерапии с включением антрациклинов на основании определения экспрессии генов *ABCC5*, *GSTM1*, *GSTT1* с учетом стадии опухолевого процесса, обладает чувствительностью 0,92, специфичностью 0,58 и эффективностью 0,67.

#### Литература

1. Океанов, А.Е. Статистика онкологических заболеваний в Республике Беларусь / А.Е. Океанов, П.И. Моисеев, Л.Ф. Левин; под ред. О.Г. Суконко. — Минск, 2015. — 204 с.
2. Портной, С.М. Лечение местно-распространенного рака молочной железы / С.М. Портной // Современные аспекты диагностики и лечения рака молочной железы: материалы Рос. науч.-практ. конф., Томск. 24–25 сент. 2008 г. — [Опубл. в журн.] Сиб. онкол. журн. — 2008. — № 2, прил. — С. 14–22.
3. Hannay, J. Molecular mechanisms of escape from chemosensitivity / J. Hannay, D. Yu // J. Med. Sci. — 2004. — Vol. 24, № 5. — P. 237–242.
4. Блохин, Д.Ю. Причины ограниченной эффективности противоопухолевой терапии с позиции клеточной биологии / Д.Ю. Блохин // Рос. биотерапевт. журн. — 2005. — Т. 4, № 3. — С. 18–23.
5. Regression methods in biostatistics: linear, logistic, survival, and repeated measures models, 2<sup>nd</sup> edition / E. Vittinghoff [et al.]. — Springer, 2012. — 509 p.
6. Park, S. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients / S. Park, C. Shimizu // Breast Cancer Res. Treat. — 2006. — Vol. 99, № 1. — P. 9–17.
7. *GSTT1* and *GSTM1* polymorphisms predict treatment outcome for acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis / Q. Xiao [et al.] // Ann. Hematol. — 2014. — Vol. 93, № 8. — P. 1381–1390.
8. Raised blast glutathione levels are associated with an increased risk of relapse in childhood acute lymphocytic leukemia / P. R. Kearns [et al.] // Blood. — 2001. — Vol. 97, № 2. — P. 393–398.

### ASSOCIATION OF ABC, GST GENE EXPRESSION WITH TUMOR RESPONSE TO CYTOTOXIC THERAPY IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY AND METASTATIC BREAST CANCER

*Tratsiak I.Yu., Demidchik Yu.E., Kostiuk S.A.*

*State Educational Institution “The Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education”, Minsk, Republic of Belarus*

Breast cancer is one of the most common cancer, an important component of which treatment is systemic chemotherapy. The most frequent mechanisms of resistance to cytostatic therapy correlated with a change of expression of glutathione-S-transferase (GST) protein and ABC-transporter family. The article highlights the issue of evaluation of tumor response to cytotoxic therapy with anthracyclines on the basis of *ABC*, *GST* genes expression in patients with inflammatory and metastatic breast cancer.

**Keywords:** metastatic, inflammatory breast cancer, ABC-transporters, glutathione-S-transferase.

Поступила 19.07.2016