

Современные молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы

Н.В. Апанович, В.П. Шубин, А.А. Коротаева, А.С. Бавыкин, Е.А. Ким, А.Д. Закиряходжаев,
В.П. Летагин, И.В. Высоцкая, А.В. Карпукхин

МГНЦ РАМН; РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН; 1-й МГМУ им. И.М. Сеченова

Контакты: Наталья Владимировна Апанович apanovich2004@mail.ru

Рассмотрены современные молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы (РМЖ). Для практического использования с целью ускорения, удешевления анализа и упрощения трактовки практикующими врачами целесообразно ограничить панель для анализа экспрессии при РМЖ генами VEGFR 1, VEGFR 2, VEGF 121, PDGFR α , mTOR, Her-2/neu, Ki-67, BRCA 1, ESR 1, Osp, BIRC 2 и BIRC 5. Эти 12 генов несут основную информацию, необходимую для выбора и прогноза химиотерапевтического лечения и служат прогностическими маркерами ответа на терапию за счет указания на потенциальные мишени терапевтического воздействия.

Ключевые слова: рак молочной железы, молекулярно-генетические маркеры, химиотерапия

Current molecular genetic markers of breast cancer

N.V. Apanovich, V.P. Shubin, A.A. Korotayeva, A.S. Bavykin, E.A. Kim, A.D. Zakiryakhodzhayev, V.P. Letyagin, I.V. Vysotskaya,
A.V. Karpukhin

Molecular Genetics Research Center, Russian Academy of Medical Sciences; N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences; I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

The paper concerns the molecular and genetic markers of breast cancer (BC). For practice use it is expedient to limit a BC expression analysis panel with the VEGFR 1, VEGFR 2, VEGF 121, PDGFR α , mTOR, Her-2/neu, Ki-67, BRCA 1, ESR 1, Osp, BIRC 2 and BIRC 5 genes to accelerate the test and reduce its cost and to simplify interpretation by physicians. These 12 genes carry basic information that is required to choose and predict a chemotherapy response and that serves as its prognostic markers, by indicating the potential therapeutic targets.

Key words: breast cancer, molecular genetic markers, chemotherapy

Введение

Высокая гетерогенность рака молочной железы (РМЖ) делает принципиально важным аспектом молекулярную характеристику опухолевых клеток, которая позволит определить «чувствительные» к определенным препаратам опухоли и в дальнейшем индивидуализировать лечение.

Основными подходами к молекулярной характеристике раковых клеток с целью выбора средства химиотерапевтического лечения в настоящее время является исследование экспрессии генов и определение в них мутаций, резко меняющих функциональное состояние гена.

Рецептор эстрогена (РЭ) является самой первой мишенью в таргетной терапии РМЖ. РЭ, который кодируется геном ER α , регулирует сложные процессы при патологии молочной железы. Повышенная экспрессия ER α при РМЖ служит предиктив-

ным и прогностическим фактором и ассоциирована с медленным развитием опухоли, низкой степенью гистологической злокачественности и эффективностью применения эндокринотерапии [1]. Более 90% дольковых карцином молочной железы имеют ER α (+), а медулярные и воспалительные карциномы — в основном ER α (-). Варианты лечения для таких больных включают антиэстрогеновые препараты, блокирующие опухолевый рост. Однако у многих пациентов в конечном счете развивается резистентность к гормонотерапии, вызванная повышенной экспрессией гена Her-2/neu [2, 3].

Her-2/neu (C-erbB-2) принадлежит к семейству тирозинкиназных рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR) и состоит из 4 функционально взаимосвязанных рецепторных молекул, которые играют важную роль в клеточной пролиферации, дифференцировке, инвазии и апоптозе.

Гиперэкспрессия гена *Her-2/neu* в ткани РМЖ обнаруживается у 25–30% больных, является независимым прогностическим маркером и предиктором необходимости применения терапии молекулярно-направленного действия. У таких пациенток используют препараты, оказывающие специфическое воздействие на *Her-2*-рецептор, — трастузумаб (герцептин) и лапатиниб [4].

Активация *Her-2/neu* может вызывать увеличение экспрессии фактора ангиогенеза эпителиального сосудистого фактора роста (VEGF), что свидетельствует о необходимости использования герцептина в комбинации с антиангиогенным агентом авастинном [5, 6].

В ходе исследования рака в центре Vanderbilt-Ingram Cancer Center (VICC) было показано, что сигнальный клеточный путь PI3-киназы (фосфоинозитол-3-киназа — PI3K) при РМЖ может быть многообещающей целью для новых методов лечения. PI3K-путь вовлечен в регуляцию множественных клеточных функций, имеющих большое значение для клеточной выживаемости и пролиферации.

Сигналы через ген *Akt* регулируются серинтреонинкиназой mTOR. mTOR вовлечена в транскрипционную и трансляционную регуляцию белков, играющих важную роль в клеточном цикле. Сигналы через PI3K, Akt и mTOR регулируют клеточный рост, метаболизм, пролиферацию и адгезию, определяющую инвазивные возможности опухолевых клеток.

Генетические изменения компонентов в сигнальном пути PI3K–Akt–mTOR включают мутации в генах *PI3K* и *PTEN* (phosphatase and tensin homolog). Этот путь играет важную роль в клеточном ответе на гипоксию и истощение энергии, а также связан с опухолевой резистентностью по отношению к радио- и химиотерапии (ХТ). В настоящее время разработаны препараты, ингибирующие mTOR, в частности темсиролимус. Темсиролимус — производное препарата сиролимуса (рапамидин), ингибирует mTOR в PI3K–Akt-пути, контролирующем трансляцию специфической мРНК. Активация mTOR имеет множественные нисходящие эффекты, в том числе увеличение экспрессии гена *HIF α* . Кроме того, у некоторых больных РМЖ выявляют мутации гена *PTEN*, что также приводит к активации этого пути.

При РМЖ PI3K–Akt–mTOR-путь может активироваться через ER, IGF-1 и *Her*-семейство [5–7].

Axl — тирозинкиназный рецептор, описанный как митогенный фактор совместно с его лигандом Gas-6. Axl — протоонкоген, экспрессирующийся во многих тканях и вместе с Tug-3 и *Mer* составляющий семейство TAM тирозинкиназных рецепторов, которые имеют общий лиганд Gas-6. Со-

вместно эти рецепторы регулируют многие процессы, включающие клеточную пролиферацию, выживание, адгезию и миграцию клеток, стабилизацию кровяного сгустка, воспалительные процессы, выброс цитокинов и фагоцитоз апоптотических клеток. *Gas-6* первоначально был идентифицирован как ген, индуцируемый в клетках при остановке клеточного роста, Axl — как трансформирующий ген при хронической миелоидной лейкемии и хронических миелопролиферативных заболеваниях. Axl присуща способность трансформировать клетки без формирования мутаций, а его повышенная экспрессия связана с плохой выживаемостью пациентов. Помимо этого, Axl принимает участие в регуляции ангиогенеза [8].

При РМЖ, так же как и при большинстве неоплазий, ангиогенез играет важную роль в росте опухоли и прогрессировании заболевания. В опухоли молочной железы существует гиперпродукция факторов VEGF. Выявлена прямая корреляционная связь между высоким уровнем этих факторов, неблагоприятным клиническим прогнозом и плохим ответом на лечение. Блокада данного процесса с помощью авастина — один из путей оптимизации лечения. Механизм его действия состоит в блокаде VEGF, что приводит к уменьшению проницаемости сосудистой стенки, интерстициального давления, увеличению доставки ХТ-средств в опухоль и торможению сосудодообразования. Эффект блокады VEGF проявляется в виде регрессии части существующих микрососудов опухоли уже на 12-й день. Через 6 мес после анти-VEGF-лечения в опухоли определяется значительное уменьшение плотности сосудов, однако уже через 3 нед после прекращения терапии отмечают обратное развитие сосудистой сети. Это свидетельствует о необходимости достаточно длительного применения таргетных препаратов с целью поддержания достигнутого результата [5, 6].

Ki-67 — антиген, экспрессия которого коррелирует с пролиферацией опухолевой ткани. В многочисленных исследованиях было показано, что при РМЖ повышение экспрессии происходит в 20–50% раковых клеток. Повышенная экспрессия *Ki-67* связана с плохим прогнозом течения заболевания. В нормальной ткани молочной железы уровень экспрессии *Ki-67* очень низкий. Интересен тот факт, что *Ki-67* отсутствует в ER(+)-тканях. По данным многих исследований, высокий уровень экспрессии *Ki-67* ассоциирован с лучшим ответом на ХТ. По отношению к ГТ связи с повышенным базальным уровнем *Ki-67* не установлено [9, 10].

Мутации в генах-супрессорах *BRCA 1/2* обусловлены развитием РМЖ и рака яичников (РЯ). Ген *BRCA 2* в основном связан с семейным РМЖ

и в меньшей степени — с РЯ. Однако мутации в гене *BRCA 2* ассоциированы с пониженным риском развития РЯ по сравнению с таковым при мутациях гена *BRCA 1* [11]. Также мутации в гене *BRCA 2* могут приводить к развитию различных видов рака у мужчин, таких как рак предстательной железы, желудка, мочевого пузыря и базально-клеточная карцинома. *BRCA 1*, по-видимому, напрямую взаимодействует с белком P53, с голоферментом РНК-полимеразы, с транскрипционными факторами CREB, с двумя терминирующими белками — BAP 1 и BARD 1, ER α (с подавлением его функции), с промотором гена *c-MYC* (подавляющим экспрессию онкогенов) и промоторами других генов. Белки *BRCA 1/2* обнаружены также в комплексе с Rad 51 (белок, отвечающий за репарацию повреждений ДНК). При повреждении ДНК *BRCA 1* фосфорилируется ATM/ATR-киназами [1].

Один из наиболее важных механизмов репарации — использование различных ингибиторов, предотвращающих образование поврежденных ДНК-доменов. PARP 1 — poly(ADP-ribose) polymerase — белок, подавляющий накопление поврежденных ДНК путем вырезания поврежденных регионов при гомологичной репарации, где важную роль имеют белки опухолевых супрессоров *BRCA 1* и 2. Некоторыми исследователями было продемонстрировано, что значение экспрессии гена *BRCA 1* может быть связано с выбором противоопухолевого препарата. Так, некоторые таксаносодержащие препараты эффективны при лечении больных РЯ при *BRCA 1(+)*, а некоторые — при *BRCA 1(-)* [12].

Одной из наиболее неблагоприятных форм в современной клинической практике принято считать тройной негативный рак — РЭ-, РП- (РП — рецепторы прогестерона), Her-2/neu. Данный тип опухоли характеризуется неблагоприятным прогнозом независимо от уровня регионарной распространенности процесса, специфичностью метастазирования (преимущественно в легкие и головной мозг) и короткими периодами безрецидивной и общей выживаемости. При этом, несмотря на отсутствие ответа на таргетную терапию (при учете отрицательного тройного рецепторного статуса), тройной негативный рак отличается достаточно высокой чувствительностью к ХТ.

Yamamoto et al. разделили данный тип рака на 2 подтипа: истинно базальноподобный и небазальноподобный. Базально-клеточные формы характеризуются наличием нескольких иммуногистохимических параметров, таких как РЭ-, РП-, Her-2/neu-, EGFR и CK 5/6. Именно эти опухоли имеют агрессивное течение и в то же время высокую чувствительность к ХТ. Небазально-клеточные виды РМЖ, хотя и имеют тройной негативный ста-

тус, часто представлены редкими формами РМЖ (медулярный, аденокистозный и др.), которые характеризуются более низкой частотой ответа на проводимую ХТ, а в некоторых случаях — полным отсутствием ответа.

Остеопонтин (ОПН) — внеклеточный гликофосфопротеин, связывающийся с α_v -содержащими интегринами и играющий важную роль в неопластической трансформации, озлокачествлении и миграции раковой клетки — метастазировании. С помощью антисмысловой кДНК ОПН ингибирует клеточный рост и участвует в процессах трансформации клеток опухоли. Повышенная экспрессия ОПН при первичном РМЖ связана с развитием ранних метастазов и плохим прогнозом. Взаимодействие ОПН с клеточными рецепторами может спровоцировать активацию различных сигнальных путей и привести к изменению экспрессии генов, влияющих на активность клеток, в том числе к миграции и инвазии. По этим эффектам ОПН можно различить типы клеток, например, в процессе наблюдения, как изменяется экспрессия интегринов и какие сигнальные пути могут быть активированы. По некоторым данным, в регуляции активности ОПН могут принимать участие гены-супрессоры, в частности *BRCA 1*, в основном при РМЖ [13, 14].

Сообщество ассоциированных с апоптозом генов представляет собой весьма значимую группу генов, которые служат показателями важных аспектов опухолевой прогрессии — пролиферации, злокачественности (C-Myc, Survivin), восприимчивости к ХТ (c-IAP1, FLIP, Caspase 8) и другим стрессовым воздействиям (белки теплового шока).

Группа генов, кодирующих разнообразные гомологи подобных бакуловирусных доменов (BIR) и обладающих антиапоптотической активностью, включает c-IAP1, c-IAP2, Survivin. Общая черта всех представителей семейства IAP заключается в присутствии домена BIR (Baculovirus — повтор, состоящий из ~ 70 аминокислот) в количестве 1–3 повторов.

Считается, что ингибитор апоптоза c-IAP1 работает в синергизме с c-IAP2 (BIRC2) и приводит к протеосомной деградации каспаз 3, 7 и 9. Гиперэкспрессия c-IAP наблюдается во многих опухолях молочной железы. Чаще всего повышенный уровень ингибиторов апоптоза c-IAP1, c-IAP2 и XIAP регистрируют в опухолях молочной железы, имеющих амплификацию гена *HER-2/neu*. Показано, что 32% больных с этой амплификацией полностью положительно отвечают на терапию с использованием герцептина. Резистентность опухоли во многом связывают с высокой активностью IAP [15].

Survivin (BIRC 5) является членом семейства ингибиторов апоптоза (IAP). От всех других пред-

ставителей своего семейства Survivin отличается наличием лишь одного BIR-домена в структуре. Survivin направленно ингибирует каспазы и является отрицательным регулятором запрограммированной смерти клетки. В процессе клеточного деления наибольшая концентрация Survivin наблюдается в фазе G₂. Установлено, что Survivin может взаимодействовать с тубулином и участвовать в регуляции митоза. С помощью методов цветной флюоресценции была установлена локализация Survivin и его изоформ в митохондриях и комплексе Гольджи. Молекулярные механизмы регуляции Survivin по-прежнему изучены недостаточно. Известно, что он является представителем Wnt-пути, и экспрессия его повышается под действием β-катенина. Выявлено, что белок p53 дикого типа подавляет экспрессию Survivin. Продукт экспрессии гена *Survivin* в больших концентрациях присутствует во многих опухолях человека и эмбриональной ткани, но полностью отсутствует в дифференцированных клетках. Таким образом, Survivin представляется удобной мишенью для противораковой терапии [16, 17].

FLIP (CFLAR) является негативным регулятором апоптоза. Белок обладает доменом, подобным домену каспазы-8 (CASP8), благодаря чему и получил свое название — CFLAR (Casp 8 and FADD-like apoptosis regulator), или FLICE-подобный ингибирующий белок — FLIP. FLIP задействован в регуляции апоптоза путем связывания с адаптерными молекулами FADD и блокированием таким образом сигнала, запускающего каспазный каскад. Адаптерная молекула FADD формирует комплекс с прокаспазой-8, который при посредническом участии FLIP вызывает высвобождение каспазы-8 и всего последующего каспазного каскада, что в конечном итоге приводит к клеточной гибели. При РМЖ FLIP является удобной мишенью для лекарственной терапии. Полагают, что в раковых клетках фоновый уровень концентрации FLIP может быть повышенным для апоптотической профилактики раковой клетки, которая без высокой концентрации IAP может погибнуть. Так, в ряде исследований продемонстрировано, что инактивация FLIP в клетках MCF-7 РМЖ приводит к лиганд-независимому апоптозу [18, 19].

Активация каспазы-8 происходит через стадию прокаспазы-8 после сигнала, переданного от рецептора Fas через адаптер FADD [18]. Образуются агрегаты FasL — Fas — FADD — прокаспаза-8. Подобные агрегаты, в которых происходит активация каспаз, названы апоптосомами, апоптозными шаперонами или сигнальными комплексами, индуцирующими гибель клетки. Прокаспазы обладают незначительной протеолитической активностью, составляющей 1–2% ак-

тивности зрелой каспазы. Будучи в мономерной форме, прокаспазы, концентрация которых в клетке ничтожна, находятся в латентном состоянии. Предполагается, что пространственное сближение молекул прокаспаз при их агрегации приводит к образованию активных каспаз через механизм протеолитического само- и перекрестного расщепления (ауто- или транспроцессинг). В результате от прокаспазы отделяется регуляторный N-концевой домен (продомен), а оставшаяся часть молекулы разделяется на большую (~20 кДа) и малую (~10 кДа) субъединицы.

Затем происходит ассоциация большой и малой субъединиц. Два гетеродимера образуют тетрамер с 2 каталитическими участками, действующими независимо друг от друга. Таким образом, прокаспаза-8 активируется и высвобождается в цитоплазму в виде каспазы-8. Существуют другие пути активации каспазы-8 — с участием рецепторов TNFR1 и D3. На этапе активации каспаз первого эшелона жизнь клетки еще можно сохранить. Существуют регуляторы, которые блокируют или, напротив, усиливают разрушительное действие каспаз первого эшелона. К ним относят белки Bcl-2 и Bax. Каспаза-8 активирует каспазу второго эшелона (эффektorная каспаза): посредством протеолиза из прокаспазы-3 образуется каспаза-3, после чего процесс, запущенный программой смерти, оказывается необратимым. В большинстве опухолей уровень каспазы-8 является подавленным, что служит своеобразным маркерным признаком ингибирования апоптоза [20].

Белки теплового шока появляются на поверхности клеток синовиальной оболочки при бактериальных инфекциях. Большинство белков теплового шока образуется и в ответ на другие повреждающие воздействия. Возможно, именно они помогают клетке пережить стрессовые ситуации. Существует 3 основных семейства белков теплового шока: с молекулярной массой 25, 70 и 90 кДа (hsp25, hsp70 и hsp90). В нормальных клетках было обнаружено множество очень похожих между собой белков из каждого семейства. Белки теплового шока помогают переводить в раствор и вновь сворачивать денатурированные или неправильно свернутые белки.

Лучше всего изучены белки семейства hsp70. Они связываются с некоторыми другими белками, а также с аномальными белковыми комплексами и агрегатами, от которых потом освобождаются, присоединяя аденозинтрифосфат (АТФ). Эти белки помогают переводить в раствор и заново сворачивать агрегированные или неправильно свернутые белки путем нескольких циклов присоединения и гидролиза АТФ. Аномальные бел-

ки имеются в любой клетке, однако при некоторых воздействиях, например при тепловом шоке, содержание их в клетке резко возрастает, и соответственно возникает необходимость в большом количестве белков теплового шока. Оно обеспечивается активацией транскрипции определенных генов теплового шока. Hsp70 принимает участие в АТФ-зависимом разворачивании полипептидных цепей, делая неполярные участки полипептидных цепей доступными действию протеолитических ферментов. Семейство белков Hsp70 кодируется 13 основными генами, наибольший интерес из которых представляют гены *HspA1*, *HspA5* и *HspA12B*, ассоциирующиеся с повышенной выживаемостью раковых клеток [21].

C-тус входит в состав семейства генов, включающего, кроме самого *c-тус*, еще 3 члена: *N-тус*, *L-тус* и *S-тус*. Все *C-*, *L-*, и *N-тус* способны трансформировать фибробласты в комбинации с активированным геном *ras*. Регуляция гена *C-тус* устроена достаточно сложным образом и является результатом действия многих позитивных и негативных регуляторов, изменяющих свою активность в зависимости от физиологических условий и взаимодействующих друг с другом.

Повреждение нормального контроля экспрессии гена *C-тус* приводит к возникновению и развитию различных типов опухолей и трансформации клеток в культуре ткани. Изменения в экспрессии *C-тус* могут происходить в результате амплификации гена, встраивания вирусов или перестройки гена под влиянием хромосомных транслокаций. Амплификация гена *C-тус* показана в ряде типов рака, в том числе и в РМЖ. Усиленная экспрессия *C-тус* в опухолевых клетках может осуществляться за счет увеличения числа копий гена.

Проведенный выше анализ привел к формированию следующего ряда из 23 генов, участвующих в контроле пролиферации, апоптоза, инвазии и ангиогенеза, для изучения характеристик их экспрессии при РМЖ: *ESR1*, *Her2*, *Ki-67*, *BRCA1*, *BRCA2*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGF121*, *PDGFR α* , *PDGFR β* , *PI3K*, *PTEN*, *AXL*, *mTOR*, *EGFR*, *Raptor*, *Osteopontin*, *HspA5*, *FLIP*, *BIRC2*, *Casp8*, *BIRC5*, *C-тус*.

Материалы и методы

Из свежемороженых образцов нормальной и опухолевой ткани, полученной при выполнении операции или биопсии, тотальную РНК выделяли при помощи набора Yellow Solve (Клоноген, Санкт-Петербург). Чистоту и качество выделения контролировали с помощью электрофореза в 3% агарозном геле. Качественными считали образцы РНК, демонстрирующие четкие полосы 18S и 28S РНК

без детектируемой электрофоретически примеси ДНК. Концентрацию выделенной РНК определяли спектрофотометрически при помощи NanoDrop ND-1000 UV/VIS (NanoDrop Technologies, США).

Обратную транскрипцию проводили с использованием в качестве затравки случайных гексамеров и набора ImProm-III^М Reverse Transcription.

Количественное определение экспрессии генов осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе Step One Plus фирмы Applied Biosystems (США).

Материалом для исследования послужили образцы опухолевой ткани, полученные при выполнении кор- или трепанобиопсии, а также после проведения оперативного вмешательства у 50 больных РМЖ разных стадий (табл. 1).

Таблица 1. Распределение больных изучаемой группы в зависимости от стадии опухолевого процесса

Стадия	Число больных	
	абс.	%
T1N0M0	3	6
N2N0M0	17	34
T1N1M0	7	14
T2N1M0	11	22
T2N2M0	3	6
T4N2M0	9	18
Всего...	50	100

Клиническими критериями включения больных в исследование были цитологически верифицированный первичный РМЖ и размер опухоли в молочной железе ≥ 2 см.

Биопсию опухоли выполняли у пациенток с первичным местно-распространенным РМЖ и у больных с III клинической стадией РМЖ до начала проведения неoadъювантной ХТ. Второй биопсийный материал был получен после осуществления оперативного вмешательства. Средний возраст пациенток, вошедших в исследование, составил 49,6 года, что несколько выше общепринятого возрастного интервала наибольшей заболеваемости РМЖ в популяции. Сохранная репродуктивная функция зарегистрирована у 19 (38%) больных, ранняя (до



Рис. 1. Распределение больных (%) в зависимости от стороны поражения

5 лет) менопауза отмечена в 21 (42%) клиническом случае, у остальных 10 (20%) пациенток период менопаузы продолжался >5 лет. Распределение больных в зависимости от локализации опухоли (сторона поражения) представлено на рис. 1.

В соответствии с данными рис. 1 поражение правой и левой молочной железы встречалось практически с одинаковой частотой. Случаев двустороннего синхронного поражения не зафиксировано.

Распределение пациенток в зависимости от локализации опухолей в различных квадрантах молочной железы отражено на рис. 2.



Рис. 2. Распределение больных (%) в зависимости от расположения опухоли в квадрантах молочной железы

Следует отметить, что расположение первичной опухоли в наружных и внутренних квадрантах имело место практически в равном числе случаев (38 и 44% соответственно), реже опухоль была локализована в центральном отделе молочной железы (18%).

Морфологическая структура опухолей была изучена у всех больных (табл. 2).

Как видно из данных, представленных в табл. 2, наиболее часто встречающимся гистологическим вариантом был инфильтративный протоковый рак — 32 (64%) клинических случая, а самой редкой формой — смешанный (протоково-дольковый) вариант новообразования — 4 (8%) наблюдения.

Таблица 2. Распределение больных в зависимости от морфологии опухолей

Морфологическое строение опухоли	Число больных	
	абс.	%
Инфильтративно-протоковый РМЖ	32	64
Инфильтративно-дольковый РМЖ	14	28
Смешанный РМЖ	4	8
Всего...	50	100

Помимо гистологической структуры, в изучаемой группе были оценены так называемые благоприятные и неблагоприятные морфологические критерии прогноза. К благоприятным прогностическим факторам относили гистиоцитоз синусов лимфатических узлов (ЛУ) и выраженность местной лимфоцитарной перифокальной инфильтрации. Параметры неблагоприятного прогноза включали наличие раковых эмболов в кровеносных и/или лимфатических сосудах, прорастание капсулы ЛУ, отсутствие псевдокапсулы опухоли.

Распределение пациенток в зависимости от исковых факторов представлено на рис. 3.

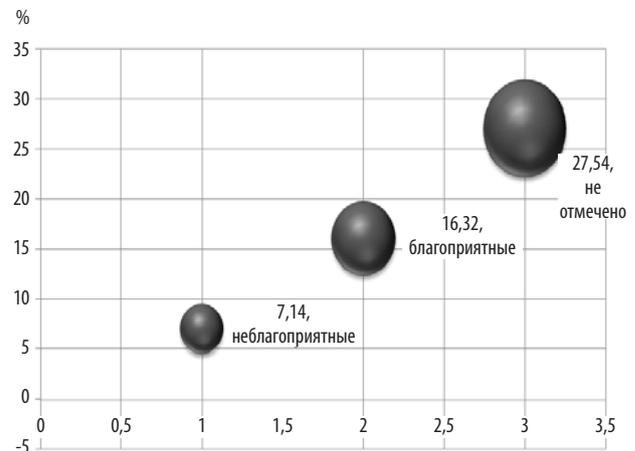


Рис. 3. Распределение больных в зависимости от морфологических факторов прогноза

Необходимо отметить, что наименьшей по численности была группа с наличием неблагоприятных критериев прогноза — всего 7 (14%) клинических наблюдений.

В целом по исследованию наиболее распространенной была II степень злокачественности опухолей — 32 (64%) клинических случая (табл. 3).

Таблица 3. Распределение больных в зависимости от степени злокачественности опухолей

Степень злокачественности опухоли	Число больных	
	абс.	%
I	9	18
II	32	64
III	9	18
Всего...	50	100

Таблица 4. Her-2/neu-статус опухолей в изучаемой группе

Статус Her-2/neu	Число больных	
	абс.	%
Отрицательный	43	86
Положительный	7	14
Всего...	50	100

Таблица 5. Распределение больных в зависимости от рецепторного статуса опухолей

Рецепторный статус	Число больных	
	абс.	%
РЭ+РП+	11	22
РЭ+РП-	9	18
РЭ-РП+	5	10
РЭ-РП-	25	50
Всего...	50	100

Встречаемость I и III степеней злокачественности была равнозначной — по 9 (18%) случаев соответственно.

Исследование статуса рецепторов к стероидным гормонам в опухоли, а также критерия *Her-2/neu* отражено в табл. 4 и 5.

В изучаемой группе пациенток гиперэкспрессия или амплификация *Her-2/neu* в опухолевой ткани зарегистрирована в 7 (14%) наблюдениях (см. табл. 4).

Таким образом, превалировали рецепторонегативные по обоим типам рецепторов опухоли, составившие 50–25% клинических случаев. Вторыми по

частоте являлись как РЭ+, так и РП+ новообразования — 11 (22%) наблюдений. Остальные варианты встречались реже.

Еще один важный прогностический фактор — число метастатически измененных регионарных ЛУ. Распределение больных в зависимости от данного параметра характеризует рис. 4.

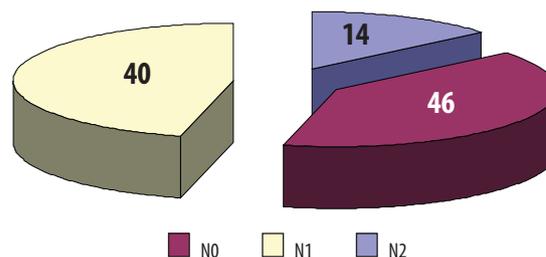


Рис. 4. Распределение больных (%) в зависимости от степени поражения регионарных ЛУ

Отсутствие локорегионарного распространения отмечено в 23 (46%) клинических наблюдениях. У 40% пациенток зарегистрировано поражение 1–2 регионарных ЛУ. У остальных больных метастазы были выявлены более чем в 4 ЛУ. В 2 наблюдениях число метастазов в регионарной клетчатке превышало 10.

В случае наличия местно-распространенного РМЖ или при планировании выполнения органосохраняющей операции программа комплексной терапии включала неоадьювантный этап.

У 10 (20%) пациенток, помимо антрациклинсодержащих комбинаций, использовали паклитаксел. В 40 (80%) клинических случаях больным проводили 4 цикла ХТ в стандартном режиме САФ (циклофосфан, адриабластин, 5-фторурацил).

Введения осуществляли одновременно с интервалом между курсами 21 день. Паклитаксел вводили из расчета 175 мг/м² (табл. 6).

Таблица 6. Виды предоперационного лечения

Схема лечения	Число больных	
	абс.	%
САФ — 2 цикла + паклитаксел	10	20
САФ — 4 цикла	40	80
Всего...	50	100

В настоящем исследовании у 6 больных, получивших комбинацию САФ с паклитакселом, отмечены выраженные дегенеративно-дистрофические изменения в ткани опухоли. В остальных 34 случа-

Таблица 7. Распределение больных в зависимости от типа операции

Вид операции	Число больных	
	абс.	%
Радикальная мастэктомия	41	82
Радикальная резекция	9	18
Всего...	50	100

ях степень терапевтического патоморфоза трактовалась как умеренно либо слабо выраженная.

Все пациентки исследуемой группы получили хирургическое лечение в различном объеме (табл. 7).

В большинстве клинических наблюдений ($n=41$; 82%) больным была выполнена радикальная мастэктомия с сохранением обеих грудных мышц. У 9 (18%) пациенток благодаря осуществлению радикальной резекции удалось сохранить молочную железу.

Изменения экспрессии генов в опухоли отражали в виде отношения к соответствующей характеристике в нормальной ткани ($\Delta\Delta\text{Ст}$). Изучение отклонений получаемых результатов при многократном повторении экспериментов показало, что размах значений $\Delta\Delta\text{Ст} < 2$. В соответствии с этими данными действительными считали изменения экспрессии в опухоли при значениях $\Delta\Delta\text{Ст} > 2$. На рис. 5 представлены результаты исследования экспрессии указанных выше генов.

Как видно из диаграммы, представленной на рис. 5, в данном образце опухоли РМЖ существенно активирован ген *Her-2/neu* (см. рис. 5а), что указывает на целесообразность использования при проведении ХТ герцептина. Активация гена РЭ (*ESR 1*, см. рис. 5б) свидетельствует о необходимости применения тамоксифена или ингибиторов ароматазы. В то же время гены, связанные со стимуляцией опухолью ангиогенеза (*VEGFR 1*, *VEGFR 2*, *VEGF 121*, *PDGFR α* , *PDGFR β*), в этой опухоли не активированы (см. рис. 5а). Следовательно, назначение данной пациентке антиангиогенной ХТ не является необходимым.

Активная экспрессия гена *PTEN* свидетельствует о противодействии активации сигнального пути *PI3K–Akt–mTOR*, которая может стимулироваться высокой экспрессией гена *Her-2/neu*. В связи с тем что ген каспазы-8 (*CSP 8*, см. рис. 5в) не активирован, апоптоза по данному пути не происходит. Возможно, это обусловлено умеренной активацией антиапоптотических генов *BIRC 2* и *BIRC 5* (см. рис. 5в). Повышенная экспрессия гена ОПН (*Ostp*, см. рис. 5в) может свидетельствовать об активной про-

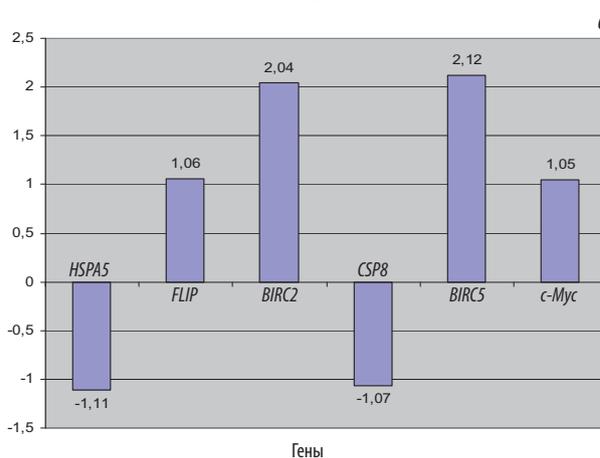
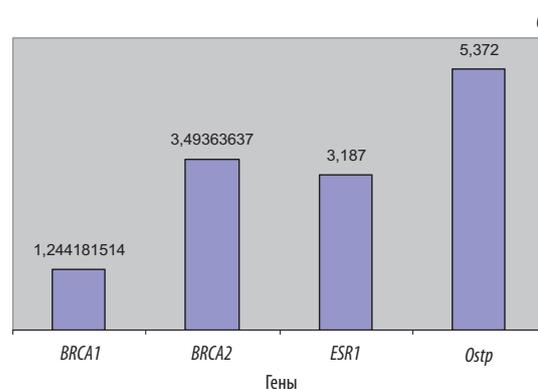
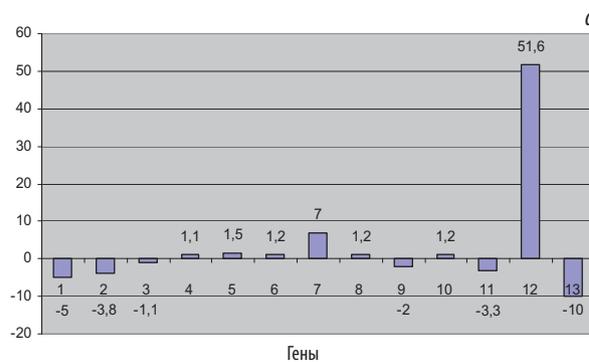


Рис. 5. Уровни экспрессии генов в образце опухоли РМЖ относительно экспрессии в нормальной ткани молочной железы. По оси абсцисс даны гены: а — 1 — *VEGFR 1*; 2 — *VEGFR 2*; 3 — *VEGF 121*; 4 — *PDGFR α* ; 5 — *PDGFR β* ; 6 — *PI3K*; 7 — *PTEN*; 8 — *Axl*; 9 — *mTOR*; 10 — *EGFR*; 11 — *Panmap*; 12 — *Her-2/neu*; 13 — *Ki-67*; б — *BRCA 1*, *BRCA 2*, *ESR 1*, *Ostp*; в — *HSPA 5*, *FLIP*, *BIRC 2*, *CSP 8*, *BIRC 5*, *c-Myc*. По оси ординат представлено отношение уровней экспрессии указанных генов в опухоли и нормальной ткани. Отрицательные значения приведены для наглядности и отражают меньшие значения экспрессии в опухоли по сравнению с таковыми в нормальной ткани

лиферации раковых клеток и опасности метастазирования клеток опухоли.

На рис. 6 продемонстрированы результаты исследования экспрессии указанных выше генов для образца опухолевой ткани другой больной РМЖ.

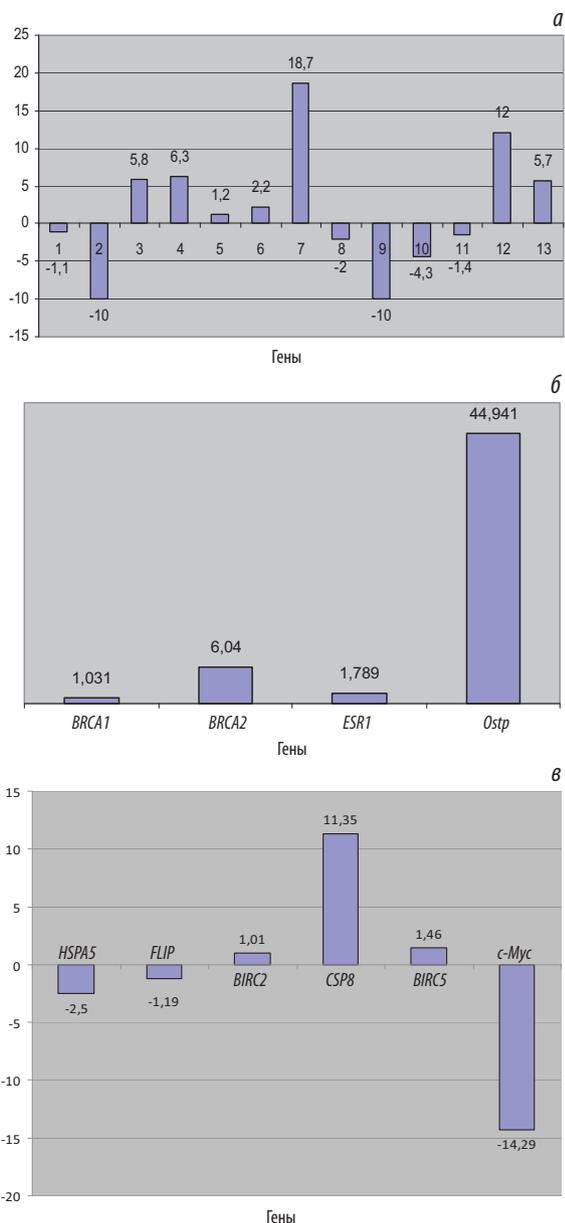


Рис. 6. Уровни экспрессии генов в образце опухоли РМЖ относительно экспрессии в нормальной ткани молочной железы. По оси абсцисс даны гены: а — 1 — VEGFR 1; 2 — VEGFR 2; 3 — VEGF 121; 4 — PDGFR α ; 5 — PDGFR β ; 6 — PI3K; 7 — PTEN; 8 — Axl; 9 — mTOR; 10 — EGFR; 11 — PanTop; 12 — Her-2/neu; 13 — Ki-67; б — BRCA 1; BRCA 2; ESR 1, Ostp; в — HSPA 5, FLIP, BIRC 2, CSP 8, BIRC 5, c-Мус. По оси ординат представлено отношение уровней экспрессии указанных генов в опухоли и нормальной ткани. Отрицательные значения приведены для наглядности и отражают меньшие значения экспрессии в опухоли по сравнению с таковыми в нормальной ткани

Как показано на рис. 6, в другом образце опухоли РМЖ также существенно активирован ген *Her-2/neu* (см. рис. 6а), что указывает на целесообразность использования при ХТ герцептина. Однако отсутствует активация гена РЭ (*ESR 1*, см. рис. 6б), и проведения антиэстрогеновой терапии в данном случае не требуется. В то же время отмечена активация 2 генов, связанных со стимуляцией ангиогенеза — *VEGF 121* и *PDGFR α* (см. рис. 6а). Следовательно, данной больной показана антиангиогенная терапия.

Активная экспрессия гена *PTEN*, так же как и в первом из описанных случаев, свидетельствует о противодействии активации сигнального пути PI3K—Akt—mTOR, которая может стимулироваться высокой экспрессией гена *Her2/neu*. В данном случае наблюдается активация гена каспазы-8 (*CSP 8*, см. рис. 6в), что указывает на наличие апоптотических процессов в опухоли. Это явление сопровождается отсутствием активации антиапоптотических генов (*HSPA 5*, *FLIP*, *BIRC 2* и *BIRC 5*, см. рис. 6в). Высокая экспрессия гена ОПН (*Ostp*, см. рис. 6б) может свидетельствовать об активной пролиферации раковых клеток и высоком потенциале метастазирования. В отличие от предыдущего образца в данном случае активирован ген *Ki-67* (см. рис. 6а), что может служить показателем хорошего ответа на ХТ.

Заключение

В результате проведенного и представленного выше анализа следует, что наибольшей информативностью с точки зрения оптимизации режима лекарственной терапии, выбора ХТ, а также предсказания возможного варианта течения опухолевого процесса обладает основное число генов, выбранных для экспериментального исследования.

Однако для практического использования с целью ускорения, удешевления анализа и упрощения трактовки практикующими врачами целесообразно ограничить панель для анализа экспрессии при РМЖ генами *VEGFR 1*, *VEGFR 2*, *VEGF 121*, *PDGFR α* , *mTOR*, *Her-2/neu*, *Ki-67*, *BRCA 1*, *ESR 1*, *Ostp*, *BIRC 2* и *BIRC 5*. Эти 12 генов несут основную информацию, необходимую для выбора и прогноза ХТ-лечения и служат прогностическими маркерами ответа на терапию за счет указания на потенциальные мишени терапевтического воздействия.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Pankaj T., Dejan M., Fumitake K. et al. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. *Clin Med Insights Oncol* — 2010;15–34.
2. Jensen E.V., Jordan V.C. The estrogen receptor: a model for molecular medicine. *Clin Cancer Res* 2003;9:1980.
3. Margeli M., Cirauqui B., Castella E. et al. The prognostic value of BRCA1 mRNA expression levels following neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *PLoS One* 2010;9499.
4. Anders C.K., Carey L.A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2009;2:73–81.
5. Schlotter C.M., Vogt U., Allgayer H. et al. Molecular targeted therapies for breast cancer treatment. *Breast Cancer Res* 2008;10:211.
6. Hobday T.J., Perez E.A. Molecularly targeted therapies for breast cancer. *Cancer Control* 2005;12(2):73–81.
7. Chu D., Lu J. Novel therapies in breast cancer: what is new from ASCO 2008. *J Hematol Oncol* 2008.
8. Gustafsson A., Martuszewska D., Johansson M. et al. Differential expression of Axl and Gas6 in renal cell carcinoma reflecting tumor advancement and survival. *Clin Cancer Res* 2009;15:4742–9.
9. Taneja P., Maglic D., Kai F. et al. Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. *Clinical Medicine Insights. Oncology* 2010;4:15–34.
10. Urruticoechea A., Smith I.E., Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23(28):7212–20.
11. Zakhartseva L.M., Gorovenko N.G., Podolskaya S.V. et al. Breast cancer immunohistochemical features in young women with BRCA 1/2 mutations. *Exp Oncol* 2009;31:174–8.
12. Stebbing J., Ellis P., Tutt A. PARP inhibitors in BRCA1-/BRCA2-associated and triple-negative breast cancers. *Future Oncol* 2010;485–6.
13. Rodrigues L.R., Teixeira J.A., Schmitt F.L. et al. The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2007;1087–97.
14. Shevde L.A., Das S., Clark D.W., Samant R.S. Osteopontin: an effector and an effect of tumor metastasis. *Curr Mol Med* 2010;71–81.
15. McManus D.C., Lefebvre C.A., Cherton-Horvat G. et al. Loss of XIAP protein expression by RNAi and antisense approaches sensitizes cancer cells to functionally diverse chemotherapeutics. *Oncogene* 2004;23:8105–17.
16. Fandy T.E., Shankar S., Srivastava R.K. Smac/DIABLO enhances the therapeutic potential of chemotherapeutic drugs and irradiation, and sensitizes TRAIL-resistant breast cancer cells. *Mol Cancer* 2008;7:60–9.
17. Hunter A.M., LaCasse E.C., Korneluk R.G. The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets. *Apoptosis* 2007;12:1543–68.
18. Day T.W., Huang S., Safa A.R. c-FLIP knockdown induces ligand-independent DR5-, FADD-, caspase-8-, and caspase-9-dependent apoptosis in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2008;76(12):1694–704.
19. Day T.W., Sinn A.L. c-FLIP gene silencing eliminates tumor cells in breast cancer xenografts without affecting stromal cells. *Anticancer Res* 2009;29(10):3883–6.
20. De Ligio J.T., Velkova A., Zorio D.A. et al. Can the status of the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene 1 product (BRCA 1) predict response to taxane-based cancer therapy? *Anticancer Agents Med Chem* 2009;543–9.
21. Song L., Xu Z., Zhang C. et al. Up-regulation of the HSP72 by Foxa1 in MCF-7 human breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386(1):30–4.
22. Foster F.M., Owens T.W., Taniaris-Hughes J. et al. Targeting inhibitor of apoptosis proteins in combination with ErbB antagonists in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11(3):1–13.
23. Palmieri C., Cheng G.J., Saji S. et al. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002;9:1–13.
24. Sommer S., Fuqua S.A. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2001;11:339–52.
25. Tanaka K., Iwamoto S., Gon G. et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127–34.