

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОНКОЛОГИИ»
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

ЛИТВЯКОВ

Николай Васильевич

**Регуляция экспрессии генов множественной лекарственной
устойчивости в опухоли молочной железы при проведении
неoadьювантной химиотерапии**

14.01.12 – онкология (биологические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор биологических наук, профессор
Чердынцева Надежда Викторовна

Томск - 2014

Список сокращений

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АХТ – адьювантная химиотерапия

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЗНО – злокачественные новообразования

ИГХ – иммуногистохимия

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МЧ-ПЦР – метилчувствительная ПЦР

НАХТ – неоадьювантная химиотерапия

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РМЖ – рак молочной железы

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТБЕ – трис-боратный буфер

УЗИ – ультразвуковое исследование

ABC – ATP-Binding Cassette

CGH – Comparative Genomic Hybridization

CNA – Copy Number Aberration (абберации числа копий)

DTT – дитиотриэтол

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

ER – рецептор эстрогенов

HER2 – рецептор эпидермального фактора роста

LOH – потеря гетерозиготности

MHC I – главный комплекс гистосовместимости I класса

OR – отношение шансов

Pgp – P-гликопротеин

PR – рецептор прогестерона

RIN – RNA Integrity Number

RR – относительный риск

RT-qPCR – количественная обратнo-транскриптазная ПЦР в режиме реального времени

SE – стандартная ошибка

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность исследования	5
Цель работы	9
Задачи исследования	9
Научная новизна	10
Теоретическая и практическая значимость	12
Положения выносимые на защиту	13
Апробация работы	14
Внедрение результатов исследования	14
Публикации	15
Объем и структура диссертации	15
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	16
1.1 Современные представления о неоадьювантной химиотерапии рака молочной железы	16
1.2. Множественная лекарственная устойчивость и гены ABC-транспортеров	21
1.3 Экспериментальные исследования роли ABC-транспортеров в формировании фенотипа МЛУ	24
1.4 Клинические исследования роли ABC-транспортеров в формировании фенотипа МЛУ	26
1.5 Характеристика отдельных подсемейств ABC-транспортеров	34
1.6 Регуляция экспрессии ABC-транспортеров	39
Заключение к литературному обзору	46
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	49
2.1 МАТЕРИАЛЫ	49
2.1.1 Пациенты и лечение	49
2.1.2 База данных больных РМЖ	51
2.1.3 Забор опухолевого материала	53
2.2 МЕТОДЫ	55
2.2.1 Выделение РНК	55
2.2.2 Выделение ДНК	57
2.2.3 Горизонтальный и капиллярный электрофорез	59
2.2.4 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени	59
2.2.5 Генотипирование по SNP-маркерам	62
2.2.6 Метилчувствительная ПЦР	63
2.2.7 Бисульфитная конверсия	65
2.2.8 Секвенирование	65
2.2.9 Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков МЛУ	66
2.2.10 Морфологическое исследование	67
2.2.11 Микроматричный анализ	68
2.2.12 Статистические методы	70
ГЛАВА 3 ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ ABC-ТРАНСПОРТЕРОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ ОТВЕТА НА ЛЕЧЕНИЕ	71
3.1. Экспрессия ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в зависимости от основных клинико-морфологических параметров	71
3.2. Экспрессия ABC-транспортеров у больных с различной эффективностью неоадьювантной химиотерапии	76

3.3 Значимость экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в отношении безметастатической выживаемости пациентов	89
Заключение к 3 главе	102
ГЛАВА 4 РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ABC-ТРАНСПОРТЕРОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ	106
4.1 Доказательство феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ	108
4.2 Экспрессия белков ABC-транспортеров в опухоли молочной железы	112
4.3 Экспрессия ABC-транспортеров и внутриопухолевая морфологическая гетерогенность	116
4.4 Метилирование промоторов генов ABC-транспортеров и их экспрессия в процессе НАХТ	127
4.5 Ген-супрессор опухолевого роста <i>TP53</i> и экспрессия ABC-транспортеров в опухоли молочной железы	133
4.6 Хромосомные aberrации в опухолевой ДНК и экспрессия ABC-транспортеров в процессе НАХТ	143
4.7 Клональная эволюция опухоли в процессе НАХТ и изменение экспрессии ABC-транспортеров	163
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	185
ВЫВОДЫ	208
ЛИТЕРАТУРА	212

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Рак молочной железы (PMЖ) (С.50 по МКБ-10) является наиболее распространенным злокачественным новообразованием (ЗНО) среди женского населения и в мире ежегодно выявляют более 1 млн. случаев первичного PMЖ [GLOBOCAN 2008, Jemal A., et al., 2010]. В 2009 г. в Российской Федерации зарегистрированы 54 315 новых больных раком молочной железы и 23 757 умерло от данной патологии, за пятилетний период прирост числа случаев заболевания составил 10,3% [Давыдов М.И., и др., 2011]. В результате таких высоких показателей смертности от PMЖ только по Томской области условные экономические потери общества составили в 2006 г. – 44 451 510 рублей [Писарева Л.Ф., и др., 2008]. Только хирургическое лечение получают 27,6% пациенток, а комбинированное лечение, в состав которого входит системная химиотерапия, проводят 70,4% больных PMЖ [Давыдов М.И., и др., 2011]. Системная химиотерапия может быть назначена на предоперационном и/или послеоперационном этапах, она существенно увеличивает безметастатическую и общую выживаемость и показана при трижды негативном, люминальном В, HER2-позитивном PMЖ и при наличии лимфогенных метастазов [Goldhirsch A., et al., 2013, Goldhirsch A., et al., 2011, Kaufmann M., et al., 2012, Семиглазов В.Ф., и др., 2008]. При сравнительном исследовании нескольких тысяч пациентов было показано, что предоперационная и послеоперационная химиотерапия имеют практически равные результаты 10-ти летней безметастатической и общей выживаемости [Cleator S., et al., 2005, Fisher B., et al., 1998, Wolmark N., et al., 2001]. Однако, предоперационная (неoadьювантная) химиотерапия (НАХТ) может использоваться еще и для уменьшения объема первичной опухоли и уровня региональной лимфаденопатии, обеспечивая выполнение радикального оперативного вмешательства, органосохранного лечения, а также позволяет оценивать чувствительность к послеоперационной химиотерапии [Kaufmann M., et al., 2012, Senkus E., et al., 2013].

НАХТ показана для использования у больных с местно-распространенным раком молочной железы IIIA, IIIB, или IIIC стадиями и может применяться у пациентов с IIA (T₂N₀ или T₁N₁) или IIB (T₂N₁ или T₃N₀) стадиями PMЖ [Goldhirsch A., et al., 2013, Kaufmann M., et al., 2007, Kaufmann M., et al., 2012, Schwartz G.F., et al., 2004]. Для достижения указанных выше целей НАХТ очень важно, чтобы у больных отмечался хороший ответ на химиотерапию (полная или частичная регрессия опухоли) [Bertheau P.,

et al., 2005, Fisher B., et al., 1998, Kaufmann M., et al., 2006, Kaufmann M., et al., 2003, Kuerer H.M., et al., 1998, Wolmark N., et al., 2001].

Основной причиной неэффективности химиотерапии опухоли считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), который характеризуется способностью опухолевых клеток выживать в условиях высоких доз широкого спектра химиопрепаратов. Выделяют два типа МЛУ: предсуществующую МЛУ, или исходную, ее определяют индивидуальные особенности опухоли и организма больного, кроме того, она зависит от гистогенеза опухоли, в частности высокая предсуществующая МЛУ у опухолей происходящих из метаболических активных тканей (почки, печень, поджелудочная железа, и др.). При предсуществующей МЛУ все клетки опухоли оказываются устойчивыми к химиотерапии еще до начала лечения. Второй тип лекарственной устойчивости – это приобретенная или адаптивная МЛУ, которая возникает в опухолевых клетках в процессе химиотерапии под воздействием лекарственных средств [Szakacs G., et al., 2006].

Фенотип множественной лекарственной устойчивости связывают с функционированием продуктов генов семейства АВС-транспортеров (АТР-Binding Cassette), их работу считают мажорным механизмом лекарственной устойчивости [Gillet J.P., et al., 2012]. Энергозависимые АВС-транспортеры могут экспрессироваться всеми клетками организма и в норме выполняют физиологическую функцию экспорта против градиента концентрации из клеток различных метаболитов, ксенобиотиков, холестерина, нейтральных и катионных органических соединений, глутатиона, органических анионов, лейкотриенов, нуклеотидных аналогов циклических нуклеотидов и мн. др. В опухолевых клетках АВС-транспортеры осуществляют выброс цитостатических препаратов, таргетных (лапатиниб, иресса, софатиниб, герцептин, акситиниб и др.) и гормональных средств из опухолевых клеток против градиента концентрации с затратой энергии АТФ [Amiri-Kordestani L., et al., 2012, Eechoute K., et al., 2011, Schinkel A.H., et al., 2012, Wang C.S., et al., 1997, Wind N.S., et al., 2011].

Роль генов АВС-транспортеров в формировании фенотипа предсуществующей и адаптивной МЛУ была доказана в опытах *in vitro* по их трансфекции в чувствительные к цитостатикам линии клеток и в экспериментах по индукции экспрессии АВС-транспортеров в клетках, которые в результате этого оказывались устойчивыми к химиопрепаратам [Allen J.D., et al., 2000, Gottesman M.M., et al., 2006, Hembruff S.L., et al., 2008, Kool M., et al., 1997]. В широкомасштабных исследованиях Szakacs G., et al., (2004) была изучена экспрессия всех 48 генов МЛУ в 60 раковых клеточных линиях, обработанных 1429 различными химическими агентами (противоопухолевыми

препаратами и кандидатами на роль противоопухолевых средств) и установлено, что высокий уровень экспрессии ABC-транспортеров (предсуществующая МЛЮ) и индукция их экспрессии при воздействии химиопрепаратов (адаптивная МЛЮ) определяет химиорезистентность опухолевых клеток [Szakács G., et al., 2004]. Кроме того, в исследованиях *in vitro* определены многие механизмы активации экспрессии ABC-транспортеров при воздействии химиопрепаратов и росте опухоли [Chen K.G., et al., 2012].

В клинических исследованиях предсуществующей МЛЮ было показано, что гиперэкспрессия ABC-транспортеров до воздействия химиопрепаратов наблюдается только в опухолях, происходящих из тканей, в норме экспрессирующих высокий уровень ABC-транспортеров, таких как нейробластома, астроциты, рак почки и надпочечников, гепатома, феохромоцитомы, и эти опухоли обладают высокой устойчивостью к химиотерапии [Leonard G.D., et al., 2003]. Для других опухолей не показан высокий исходный уровень экспрессии ABC-транспортеров, он был очень вариабелен. Более того, данные о связи исходного уровня экспрессии ABC-транспортеров с показателями ответа на химиотерапию: непосредственной эффективностью химиотерапии, общей и безметастатической выживаемостью пациентов оказываются крайне противоречивыми даже для опухолей одной локализации, например, при раке молочной железы [Wind N., et al., 2011]. Рядом авторов в клинике была исследована связь исходного уровня экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы с эффективностью химиотерапии [Chintamani, et al., 2005, Faneyte I.F., et al., 2004, Fletcher J.I., et al., 2010, Gillet J.P., et al., 2007, Kim B., et al., 2013, Park S., et al., 2006, Wang C.S., et al., 1997, Wind N., et al., 2011]. Неоднозначность результатов является общей чертой этих исследований и четкая связь между уровнем экспрессии ABC-транспортеров в опухоли до лечения с чувствительностью к химиотерапии так и не была идентифицирована.

Клинических исследований адаптивной или приобретенной МЛЮ немного. Ассоциацию повышения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в процессе химиотерапии с отсутствием эффекта НАХТ подтверждают результаты исследования Chevillard et al., (1996). Эти авторы, при помощи полуколичественной ПЦР и иммуногистохимических исследований, наблюдали повышение экспрессии гена *ABCBI* и его белка Р-гликопротеина в опухоли молочной железы на 8 и 28 сутки после первого цикла НАХТ у неответствующих пациентов. Atalay в 2006 году показал, что у пациентов, у которых в процессе НАХТ индуцировалась экспрессия гена *ABCBI*, отсутствовал ответ на химиотерапию [Atalay C., et al., 2006]. В мета-анализе F. Leonessa 2003 года было установлено, что в опухоли молочной железы средний уровень экспрессии *ABCBI* и частота Р-гликопротеин-позитивных опухолей повышалась в процессе НАХТ у больных

плохо отвечающих на лечение [Leonessa F., et al., 2003]. Kim и соавторы обнаружили повышение экспрессии белка Mgp1, Vcgp и P-гликопротеина в опухоли молочной железы больных при проведении НАХТ, однако уровень экспрессии этих белков до лечения и после НАХТ не коррелировал с эффектом химиотерапии [Kim B., et al., 2013].

Таким образом, немногочисленные клинические исследования адаптивной МЛУ, в определенной мере подтверждают только отсутствие эффекта лечения при стимуляции экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в процессе химиотерапии, и даже эти исследования во многом противоречивы и ограничены очень узким кругом ABC-транспортеров [Leonessa F., et al., 2003, Wind N.S., et al., 2011]. При этом совершенно не изучено, с чем связан ответ опухоли молочной железы на химиотерапию, почему, при лечении по одной и той же схеме у одних пациентов наблюдается ответ на химиотерапию, а у других лечение не эффективно, и как во всем этом участвуют ABC-транспортеры. По-видимому, в клинической ситуации, в отличие от экспериментов *in vitro* на клеточных линиях, происходит активный процесс становления МЛУ при лечении, на который оказывают влияние факторы организма и опухоли. Изучение именно этого процесса, поможет понять причины индивидуальной вариабельности ответа на химиотерапию, механизмы химиочувствительности и химиорезистентности. Это позволит разрабатывать методы прогнозирования ожидаемой эффективности химиотерапии и наметить новые стратегии регулирования фенотипа МЛУ в опухоли молочной железы.

Хорошо известны генные механизмы активации экспрессии генов ABC в опухолевых клетках в ответ на воздействие химиопрепаратов [Chen K.G., et al., 2012, Schinkel A.H., et al., 2012]. Напротив, механизмы, которые связаны с генами лекарственной устойчивости и могут обеспечивать ответ опухоли на химиотерапию, практически не известны. Среди таких возможных механизмов, которые могут теоретически обеспечить эффективный ответ на химиотерапию, можно выделить продукт гена-супрессора опухолевого роста *TP53*, связывающегося с промотором ABC-транспортеров и способного ингибировать экспрессию генов ABC [Johnson R.A., et al., 2001, Scotto K.W., 2003, Thottassery J.V., et al., 1997]. Гетерогенность клинической опухоли может вносить определенный вклад в реализацию эффективности химиотерапии [Bhatia S., et al., 2012]. Хромосомные аномалии в опухолевых клетках могут иметь важное значение в реализации активности химиопрепаратов [Han S., et al., 2010, McClelland S.E., et al., 2009]. Наконец адаптационные изменения опухолевых клонов в процессе химиотерапии способны обеспечивать вариабельность ее эффективности.

Неoadьювантную химиотерапию считают очень подходящей моделью для прямого исследования ответа на лечение, в зависимости от экспрессии генов МЛУ до и после

терапии [Gillet J.P., et al., 2011]. Учитывая этот факт, мы сосредоточили внимание на исследовании ключевых генов МЛЮ (ABC-транспортеров) экспрессируемых в опухоли молочной железы: *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1* и *ABCG2*. Кроме того, был изучен ген *MVP* (Lung Resistance-Related Protein), который функционирует как эндоплазматический и/или связанный ядерной мембраной транспортер лекарственного средства в соединении с ABC-транспортерами [Mossink M.H., et al., 2003]. Учитывая, что 7 из 8 изучаемых генов являются ABC-транспортерами, а *MVP* непосредственно связан с ними всю изучаемую группу генов для краткости мы будем называть ABC-транспортеры.

Цель работы

Исследование значимости экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы для реализации ответа на лечение и установление факторов, определяющих ее индивидуальную вариабельность в процессе неoadъювантной химиотерапии.

Задачи исследования:

1. Изучить экспрессию ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ в зависимости от основных клинико-патологических параметров заболевания и непосредственной эффективности химиотерапии.
2. Оценить прогностическую значимость экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ в отношении гематогенного метастазирования.
3. Оценить возможность нормализации уровня экспрессии ABC-транспортеров после НАХТ и в промежутках между курсами, на основе изучения динамики экспрессии генов ABC в процессе НАХТ
4. Изучить экспрессию белков ABC и соответствующих им генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в процессе НАХТ.
5. Изучить влияние внутриопухолевой морфологической гетерогенности на экспрессию ABC-транспортеров в процессе предоперационной химиотерапии.
6. Определить значение метилирования промоторных участков генов лекарственной устойчивости в регуляции их экспрессии в процессе НАХТ.
7. Изучить влияние функциональных изменений гена-супрессора опухолевого роста *TP53* на регуляцию экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы
8. Определить роль хромосомных аномалий опухолевой ДНК молочной железы в регуляции экспрессии генов лекарственной устойчивости.
9. Проанализировать изменения мутантных опухолевых клонов в процессе НАХТ и экспрессию ABC-транспортеров в процессе НАХТ
10. Сформировать модель факторов определяющих изменение экспрессии генов ABC в опухоли молочной железы в ответ на НАХТ.

Научная новизна

Впервые установлена связь изменения (повышения или снижения) экспрессии ABC-транспортёров в опухолевой ткани молочной железы в процессе лечения с клинической эффективностью НАХТ. Наши исследования четко показали, что в реализации эффекта НАХТ играет роль не предсуществующая, а адаптивная множественная лекарственная устойчивость, которая формируется за счет повышения экспрессии генов ABC-транспортёров в процессе химиотерапии, что и определяет резистентность опухоли молочной железы к химиопрепаратам. Более того, низкий уровень предсуществующей МЛУ (за счет низкой экспрессии генов ABC) в опухоли до лечения не определяет элиминацию опухолевых клонов под действием химиотерапии.

Впервые установлен феномен снижения экспрессии ABC-транспортёров в опухоли в ответ на воздействие химиопрепаратов, который впоследствии был также показан и в зарубежном исследовании. Снижение экспрессии генов ABC определяет низкую экспрессию белковых продуктов этих генов, обеспечивает объективный ответ опухоли на НАХТ и является благоприятным прогностическим фактором, не зависящим от основных клиничко-патологических параметров заболевания. Впервые выявлено однонаправленное изменение экспрессии пяти ключевых генов ABC: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* в строгом соответствии с эффектом НАХТ, которое отмечено у 75% больных и обозначено как градиентный феномен. Наличие градиентного феномена у больных РМЖ является независимым благоприятным фактором прогноза, в то время как наличие у пациента разнонаправленных изменений экспрессии ABC-транспортёров в процессе НАХТ ассоциировано с гематогенным метастазированием.

Впервые было проведено комплексное исследование механизмов и факторов, определяющих повышение или снижение экспрессии генов ABC-транспортёров в опухоли молочной железы в процессе НАХТ. Установлено, что гипо- или гиперметилирование промоторов генов ABC определяет исходный уровень экспрессии ABC-транспортёров в опухоли, или предсуществующую МЛУ, но не оказывает существенного влияния на изменения экспрессии генов ABC и формирование адаптивной МЛУ.

Впервые исследована связь разных морфологических структур инфильтративного компонента рака молочной железы с характером изменений экспрессии ABC-транспортёров и показано, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность не оказывает прямого влияния на регуляцию экспрессии генов ABC. Впервые установлено значение связанного с молекулами главного комплекса гистосовместимости 1 (МНС1) гена *ABCB3* в реализации высокого уровня химиорезистентности альвеолярных и трабекулярных структур.

Получены новые данные о вовлечении гена-супрессора опухолевого роста *TP53* в регуляцию экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы. Впервые показано, что экзонный полиморфизм *TP53+119C>G Arg72Pro rs1042522* и делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* оказывают влияние на изменения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ, установлена прогностическая значимость делеции локуса 17p13.1.

Впервые при помощи микроматричных исследований хромосомных aberrаций в опухолях больных раком молочной железы выявлены делеции локусов генов ABC-транспортеров, установлена их важная роль в негативной регуляции экспрессии своих генов в процессе НАХТ, высокая прогностическая и предсказательная значимость делеций локусов генов ABC.

Впервые идентифицированы хромосомные локусы в опухоли молочной железы, aberrации в которых связаны с регуляцией экспрессии каждого ABC-транспортера в отдельности. Показано что несбалансированные хромосомные аномалии этих локусов определяют снижение экспрессии генов ABC, в то время как нормальное состояние этих локусов связано с повышением экспрессии и формированием адаптивной МЛУ. На основе полученных данных сделан важный вывод о том, что, в большинстве случаев нет специальных механизмов снижения экспрессии генов ABC в клетках, а нарушены механизмы up-регуляции, т.е. ответа опухоли на химиопрепараты. На основе оценки этих нарушений в опухоли до лечения можно прогнозировать ожидаемую эффективность НАХТ. Нарушение механизмов up-регуляции является характерным для клинической опухоли aberrантным явлением.

На основе микроматричных исследований изменения мутантных опухолевых клонов в процессе НАХТ впервые выявлено появление новых мутантных клонов у некоторых больных, при этом у этих больных в 83% отмечается развитие гематогенных метастазов. Впервые установлено, что в процессе химиотерапии элиминируются, прежде всего, опухолевые клоны с делециями локусов генов ABC и опухолевые клоны, несущие хромосомные аномалии, связанные со снижением экспрессии ABC-транспортеров. Полученные новые знания позволили значительно расширить представления о механизмах формирования адаптивной множественной лекарственной устойчивости.

Теоретическая и практическая значимость

В результате выполнения исследования получены приоритетные данные о механизмах химиорезистентности опухоли молочной железы, установлены новые феномены и закономерности ответа опухоли на химиотерапию, выявлены генетические, морфологические и эпигенетические факторы регуляции формирования множественной

лекарственной устойчивости. Новые данные о том, что клиническая эффективность НАХТ зависит не от начального уровня экспрессии генов ABC в опухоли, а от направленности изменения уровня их экспрессии у пациента при проведении химиотерапии, значительно расширяют представления о процессе формирования фенотипа адаптивной МЛУ в клинических условиях и обосновывают новую стратегию управления множественной лекарственной устойчивостью через регулирование экспрессии ABC-транспортеров, а не через подавление активности белков ABC, как это предлагалось ранее.

Установлено, что адаптивная МЛУ, возникновение которой обусловлено повышением экспрессии ABC-транспортеров в опухоли, может продолжаться более трех месяцев, и в краткосрочном периоде не происходит естественной нормализации уровня экспрессии генов ABC в опухоли. Это может иметь важное значение при индивидуальном планировании курсов химиотерапии и совершенствовании стратегии химиотерапевтического лечения в целом, в плане определения целесообразности двухфазной химиотерапии с предоперационными и послеоперационными циклами.

Приоритетные исследования механизмов химиорезистентности морфологических структур инфильтративного компонента опухоли молочной железы, наличие которых является одним из проявлений внутриопухолевой гетерогенности, указали новое направление поиска механизмов лекарственной устойчивости этих структур, которые не связаны с мажорными механизмами МЛУ.

Выявленный феномен снижения экспрессии генов ABC транспортеров в опухоли, сопряженный с клиническим ответом на НАХТ, и результаты исследования возможных механизмов этого явления позволили сформулировать основную идею работы о том, что в большинстве случаев снижение экспрессии обусловлено нарушением в опухолевых клетках физиологических механизмов активации генов МЛУ в ответ на химиотерапию. Это позволяет обосновано предположить, что для регуляции формирования множественной лекарственной устойчивости опухоли необходимо нарушить механизмы up-регуляции их экспрессии в опухолевых клетках, например, используя сочетание таргетных препаратов, ингибирующих внутриклеточные сигнальные пути, и конвенциональных лекарственных средств, которые и будут оказывать основное противоопухолевое действие. Полученные знания могут стать основой новой стратегии управления множественной лекарственной устойчивостью опухоли.

На основе оценки изменения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы идентифицирован новый информативный прогностический фактор, который может быть определен при проведении НАХТ. Новый прогностический фактор работает не только для пациентов с полной морфологической регрессией опухоли, но и для

больных с частичной регрессией опухоли, стабилизацией или прогрессированием процесса, что значительно расширяет диапазон его возможного использования по сравнению с оценкой лекарственного патоморфоза. Установленное в работе явление градиентного феномена имеет высоко значимую связь с развитием метастатической болезни при раке молочной железы. Наличие/отсутствие в опухоли градиентного феномена – это еще один новый прогностический фактор, который позволяет прогнозировать исход РМЖ на этапах лечения после предоперационной химиотерапии.

Высокая прогностическая значимость в отношении безметастатической выживаемости делеции локуса 17p13.1 гена *TP53* определяет возможность использования оценки CNA статуса этого локуса в качестве дополнительного прогностического фактора, который может быть исследован в опухоли молочной железы до лечения. Выявленная связь делеций локусов генов ABC-транспортеров в биопсийном материале опухоли молочной железы до лечения с эффективностью НАХТ и высоким уровнем безметастатической выживаемости обосновывает перспективность использования оценки делеций локусов генов ABC в качестве маркеров прогноза ожидаемой эффективности НАХТ, для персонализированного определения целесообразности ее проведения, и в качестве дополнительного прогностического фактора. В практическом плане проведенные исследования дали возможность установить новые прогностические и предсказательные факторы и наметить мишени для терапевтического воздействия.

В целом проведенное исследование позволило решить важную научную проблему – выявить основные причины вариабельности индивидуального клинического ответа опухоли на химиотерапевтическое лечение, заложить основы персонализированного подхода к назначению НАХТ и наметить пути формирования новой стратегии управления множественной лекарственной устойчивостью опухоли.

Положения выносимы на защиту

Отсутствие клинического ответа на неoadьювантную химиотерапию обусловлено формированием адаптивной множественной лекарственной устойчивости в результате стимуляции экспрессии ABC-транспортеров в опухоли.

При объективном ответе на химиотерапию в опухоли происходит снижение экспрессии ABC-транспортеров при воздействии химиопрепаратов, по сравнению с базовым уровнем до лечения.

Снижение экспрессии ABC-транспортеров обусловлено хромосомными аномалиями в опухолевых клетках, приводящих к нарушениям физиологических механизмов активации генов ABC в ответ на химиопрепараты.

В процессе химиотерапии в первую очередь происходит элиминация опухолевых клонов с нарушениями механизмов регуляции ABC-транспортеров, которые и являются чувствительными к действию цитостатических препаратов клонами.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на:

III международной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2007), 4 Российской конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения» (С.-Петербург, 2008), Российской научно-практической конференции «Современные аспекты диагностики и лечения рака молочной железы» (Томск, 2008), V-VII конференции молодых ученых им. Академика Н.В. Васильева (Томск, 2008 - 2010), Российско-Тайваньском форуме «Опыт и перспективы развития сотрудничества между российскими и тайваньскими учеными в области изучения молекулярно-генетических механизмов развития злокачественных новообразований и использования результатов фундаментальных исследований в онкологии» (Томск, 2009), VI съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов-на-Дону, 2010), Международной конференции «Опухоль и хозяин: новые аспекты старой проблемы» (Киев, 2010), XVI и X Российских онкологических конгрессах (Москва, 2010, 2013 гг), 3rd Norwegian Cancer Symposium «Growth and Proliferation: Molecular Regulators of Cancer» (Oslo, 2011), Международной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Томск, 2011), Всероссийской конференции с международным участием «Научно-практические аспекты модернизации онкологической службы регионального уровня» (Красноярск, 2012), VII и VIII съездах онкологов и радиологов стран СНГ (Астана, 2012, Алма-Ата, 2014), VIII-IX съездах онкологов России (С.-Петербург, 2013, Казань, 2014), ESMO congress (Madrid, 2014). Результаты и автор исследования удостоены Всероссийской премии в области онкологии «In Vita Veritas» 2013 г. в номинации «За достижения в области экспериментальной онкологии».

Внедрение результатов исследования

Результаты работы включены в учебную программу и тематический план лекций для кафедры физиология человека и животных Биологического института Национального исследовательского Томского государственного университета на тему «Применение современных методов исследования генома и транскриптома в физиологии».

Используются в учебном процессе Сибирского государственного медицинского университета и включены:

– в рабочую программу послевузовской подготовки в интернатуре по специальности 040113-патологическая анатомия;

– методические рекомендации для преподавателей СибГМУ на практические и лабораторные занятия по учебной дисциплине патологическая анатомия, специальность «060101 – лечебное дело» по теме: «Клинико-морфологическая характеристика злокачественных опухолей эпителиального происхождения» для 3 курса лечебного, педиатрического, стоматологического и лечебного факультетов.

– в план чтения лекции по онкологии по теме «Молекулярные механизмы формирования и прогрессии злокачественных опухолей» на кафедре онкологии СибГМУ для студентов лечебного и педиатрического факультетов.

Разработано учебное пособие по специальностям 060101 и 060103 «Механизмы множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы», которое было утверждено на кафедре онкологии 4 октября 2013 года протокол № 7. Зарегистрирована база данных: Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013621213 от 24 сентября 2013 г. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В. «База данных экспрессионный и клинико-патологических параметров пациентов с диагнозом рак молочной железы». Разработан лабораторный набор реагентов для оценки экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости и монорезистентности под названием «MDR – MR ЭКСПРЕССИЯ», утвержден 15 октября 2013 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 45 печатных работ, в том числе 21 статья, из них 9 статей в зарубежных журналах, 1 глава в зарубежной монографии, 1 зарегистрированная база данных.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы материалов и методов, 2 глав собственных результатов исследования, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 237 страницах и иллюстрирована 38 таблицами и 38 рисунками. Библиография включает 418 литературных источников, из них 402 иностранных.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Современные представления о неоадьювантной химиотерапии рака молочной железы

В настоящее время, химиотерапевтическое лечение больных с операбельной формой РМЖ (около 85% всех больных РМЖ) включает помимо операции и системную химиотерапию в двух режимах: предоперационную или неоадьювантную и послеоперационную или адьювантную. Они имеют разные цели и могут отличаться по схемам.

Адьювантная химиотерапия (АХТ) – вспомогательное, дополняющее хирургические и лучевые методы, лекарственное лечение. Целью адьювантной терапии является длительное подавление отдаленного метастазирования рака после хирургического лечения. Невидимые микрометастазы приводят к диссеминации болезни и, в конечном счете, являются причиной онкологических больных. С этих позиций цель адьювантной терапии – увеличение выживаемости пациентов и продление безрецидивного (безметастатического) периода [Загрекова Е.И., и др., 2002, Семиглазов В.Ф. 2012, Семиглазов В.Ф., и др., 2008].

Неоадьювантная химиотерапия является необходимым компонентом комбинированного лечения женщин с местно-распространенным раком молочной железы (РМЖ) IIA, IIB, или IIC стадиями и может быть использована у женщин с IIA (T_2N_0 или T_1N_1) или IIB (T_2N_1 или T_3N_0) стадиями РМЖ [Goldhirsch A., et al., 2009, Goldhirsch A., et al., 2013, Schwartz G.F., et al., 2004]. При больших размерах опухоли применение НАХТ (в данном случае называется индукционной терапией) позволяет уменьшить объем первичной опухоли и уровень региональной лимфаденопатии, что делает возможным выполнение радикального оперативного вмешательства [Bonadonna G., et al., 1998]. В случае операбельного РМЖ, использование НАХТ позволяет сократить объем оперативного вмешательства у 50-60 % пациентов и проводить органо-сохранное лечение [Mauriac L., et al., 1991, Schwartz G.F., et al., 2004]. В зависимости от используемого режима, объективный ответ на НАХТ, включая и полную и частичную регрессию, составляет 45-65 % и у 35-55 % пациентов не достигается желаемого результата [Ferriere J.P., et al., 1998, Pierga J.Y., et al., 2003]. Во многих исследованиях было показано, что только при получении полной морфологической регрессии опухоли в ответ на проведенную НАХТ значительно улучшаются отдаленные результаты лечения (общая и безрецидивная выживаемости), и в настоящий момент полную морфологическую

регрессию оценивают как ключевой фактор прогнозирования ответа на адъювантную химиотерапию [Bertheau P., et al., 2005, Fisher B., et al., 1998, Kaufmann M., et al., 2006, Kaufmann M., et al., 2003, Kuerer H.M., et al., 1998, Wolmark N., et al., 2001]. НАХТ также может иметь некоторые недостатки. Во-первых, у пациентов с опухолями, резистентными к НАХТ, использование другого лечения может быть отсрочено на несколько недель, хотя прямая резистентность к НАХТ и прогрессия опухоли при ее проведении – редкий феномен и встречается менее чем у 5% пациентов [Fisher B., et al., 1998, van der Hage J.A., et al., 2001]. Во-вторых, существует мнение, что НАХТ может увеличивать частоту или тяжесть хирургических или лучевых осложнений, однако исследования последних 30 лет опровергли это утверждение. В-третьих, НАХТ сильно изменяет первичную опухоль и метастазы в региональных лимфоузлах, и это значительно уменьшает возможность получить точную гистологическую оценку операционного материала. Было также показано, что НАХТ изменяет прогностическое значение лимфогенного метастазирования [Bonadonna G., et al., 1998, Kuerer H.M., et al., 1999, Rouzier R., et al., 2002]. Как цинично утверждают многие исследователи НАХТ представляет собой очень хорошую модель для исследования противоопухолевого действия новых фармакологических препаратов и изучения механизмов устойчивости к лекарственным средствам [Gillet J.P., et al., 2011, Goldhirsch A., et al., 2009, Goldhirsch A., et al., 2013, Kaufmann M., et al., 2006]

Остро встает вопрос предсказания эффективности НАХТ до лечения и прогнозирования ответа на АХТ, которое позволило бы, с одной стороны, значительно оптимизировать использование химиотерапии, персонафицировано назначать НАХТ и АХТ, избавить пациентов с резистентными и малочувствительными опухолями от токсичного и дорогостоящего лечения, и планировать адъювантную химиотерапию.

Если рассматривать в общем виде, то в эффективности химиотерапии могут играть роль: 1. основные клиничко-морфологические параметры, многие из которых связаны с прогнозом заболевания и выбором методов лечения и 2. молекулярно-генетические особенности опухоли, связанные с изменениями (мутации, гипо – и гиперметилирование, амплификация и др.) в онкогенах, в генах-супрессоров и генах-модификаторах, а также с изменениями в паттерне экспрессии многочисленных генов метаболических путей, транспортных генов, генов ферментных систем и т.п. В любом случае для планирования лечения, маркер должен быть связан с прогнозом заболевания, биологией опухоли или патогенетическими механизмами лечебных манипуляций.

Для неoadъювантной химиотерапии многие клиничко-морфологические параметры, такие как гистологический тип опухоли, степень злокачественности, слабо ассоциированы с эффективностью [Rouzier R., et al., 2002, Tiezzi D.G., et al., 2007]. Размер опухоли,

лимфогенное метастазирование ассоциированы с эффективностью НАХТ, но все эти маркеры показывают низкий уровень значимости и были и только на ограниченных выборках. При T_xN_0 с большей вероятностью достигается объективный ответ на НАХТ, чем при T_xN_{1-2} ($p=0,04-0,003$) [Rouzier R., et al., 2002, Smith I.C., et al., 2002, Tiezzi D.G., et al., 2007]. В исследовании китайских авторов [Zhang B., et al., 2006] показано, что размер опухоли менее 3 см ассоциировался с ответом на НАХТ (160 больных), однако уровень значимости, при проведении логистического регрессионного анализа, не превышал 0,03. Иммуногистохимические показатели экспрессии в опухоли гормональных рецепторов (ER и PR), белков p53, p21 и рецептора эпидермального фактора роста (HER2) не коррелируют с эффективностью НАХТ [Tiezzi D.G., et al., 2007]. В исследовании [Lee J., et al., 2008] из всех изученных иммуногистохимических показателей опухоли молочной железы (ER, PR, HER-2, Ki-67) только Ki-67 показал ассоциацию с эффективностью адриомидин/доцетаксел НАХТ и общей выживаемостью (уровень значимости 0,033). В других исследованиях [Fernandez-Sanchez M., et al., 2006, Learn P.A., et al., 2005, Zhang F., et al., 2003] уровень экспрессии HER2 ассоциировался с ответом на НАХТ, но эта взаимосвязь сильно зависит от схемы химиотерапии и не является универсальной.

В исследованиях Burcombe R и коллег (2004) наоборот показали, что никакой ИГХ параметр не предсказал ответ на НАХТ. Кроме того, ряд опухолей изменяли ИГХ маркеры (ER, PR, Ki67) в процессе НАХТ [Burcombe R., et al., 2004].

Еще одним важным фактором для выбора химиотерапии является наследственный РМЖ, который составляет не более 10 % всех случаев и чаще диагностируется у женщин репродуктивного возраста моложе 35 лет. Наследственная неполноценность систем обеспечения целостности генома связана с зародышевыми мутациями в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, p53, *CHEK2* и *NBS1* [Имянитов Е.Н., и др., 2010]. Предполагается, что *BRCA1*-ассоциированные РМЖ характеризуются резистентностью к «золотому стандарту» терапии РМЖ – препаратам из группы таксанов [Byrski T., et al., 2010]. В то же время, РМЖ у *BRCA1* гетерозигот демонстрируют исключительно выраженный регресс при лечении цисплатином – хорошо известным и дешёвым препаратом, который широко используется для лечения других разновидностей опухолей, но пока не входит в стандарты терапии карцином молочной железы [Byrski T., et al., 2010, Moiseyenko V.M., et al., 2010].

Важным прогностическим фактором является мультицентричность роста опухоли, которую рассматривают как одну из форм прогрессии РМЖ [Вторушин С.В., и др., 2011]. В исследовании Coombs N.J., Voyages J. (2005) было установлено, что при мультицентрическом раке молочной железы поражение подмышечных лимфатических

узлов встречается значительно чаще, чем при уницентрическом. Это явление характерно для больных с разным гистологическим типом опухоли молочной железы. Оказалось, что лимфогенное метастазирование при мультицентрическом росте опухоли не является неблагоприятным фактором прогноза, поскольку выживаемость больных с мультифокальным и унифокальным раком молочной железы была абсолютно идентичной [Coombs N.J., et al., 2005].

Следующим важным прогностическим маркером РМЖ является степень злокачественности, которая определяется по модифицированному методу Bloom & Richardson [Bloom H., et al., 1957] и включает полуколичественную оценку трех морфологических особенностей – процента формирования тубулярных структур, степень ядерного плеоморфизма и митотический индекс. Установлена очень сильная корреляция степени злокачественности с прогнозом; у больных с I степенью значительно лучше выживаемость, чем у больных с III степенью злокачественности ($p < 0,0001$) [Elston C., et al., 1991]. Недостатком данного прогностического фактора остается высокая степень неопределенности прогноза у больных со II степенью злокачественности, которая встречается у 80-90% пациентов [Pereira H., et al., 2007, Rakha E.A., et al., 2010].

Некоторые сывороточные маркеры связаны с прогнозом РМЖ. F. Ebeling и соавт.(2002) показали, что высокий уровень СА 15–3 является неблагоприятным прогностическим фактором [Ebeling F., et al., 2002]. Несколько исследований установили, что увеличение уровней СА 15–3 и СА 27.29 после НАХТ или адъювантной терапии позволяет прогнозировать рецидивирование за 5–6 мес [D'Alessandro R., et al., 2001, Kokko R., et al., 2002, Nicolini A., et al., 2006]. Всего в рекомендациях ASCO 2007 года рассмотрено 13 маркеров опухолей молочной железы. Оказались достоверно клинически применимыми и были рекомендованы для практического использования следующие маркеры: СА 15–3; СА 27.29; РЭА (при метастатическом РМЖ); ER; PR; рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2neu) и другие [Harris L., et al., 2007, Семиглазов В.Ф., и др., 2011].

В настоящее время для определения врачебной тактики наиболее перспективным считается применение в клинической и патоморфологической практике гистогенетической классификации рака молочной железы, предложенной в 2000 г. Perou С.М. и соавт [Perou С.М., et al., 2000]. Были определены такие молекулярные подтипы рака молочной железы, как люминальный А, люминальный В, HER2 позитивный, «трижды негативные» опухоли и группа опухолей, в которой экспрессия генов молочной железы оставалась в норме. Каждый из перечисленных молекулярно-генетических типов РМЖ характеризовался рядом клинико-морфологических особенностей и диктовал

определенную тактику ведения пациенток, относящихся к той или иной группе [Parker J.S., et al., 2009].

Считается, что НАХТ показана при люминальном В, трижды-негативном, и HER2-позитивном РМЖ. Для люминального А субтипа, в сравнении с остальными, определяются низкие показатели рецидивирования и высокие цифры общей выживаемости, эта гистогенетическая группа рака молочной железы характеризуется высокой чувствительностью к гормональной терапии (тамоксифен, ингибиторы ароматазы), неоадьювантная химиотерапия не показана [Cheang M.C.U., et al., 2009, Goldhirsch A., et al., 2013, Hugh J., et al., 2009, Parker J.S., et al., 2009, Yanagawa M., et al., 2012]. Люминальный тип В встречается в 14-18% случаев, для этой группы характерно более частое лимфогенное метастазирование и рецидивирование и низкая чувствительность к гормональной терапии [Cheang M.C.U., et al., 2009, Hugh J., et al., 2009, Parker J.S., et al., 2009, Sotiriou C., et al., 2009]. Трижды-негативный рак молочной железы является агрессивной опухолью, часто имеет мутации гена *BRCA1*, метастазирует в лимфатические узлы и отдаленные органы, характеризуются более низкими показателями выживаемости. Трижды-негативный рак особенно чувствителен в НАХТ по антрациклин- и таксан-содержащим схемам [Carey L., et al., 2010, Imyanitov E.N., et al., 2007, Schneider V.P., et al., 2008]. HER2-позитивный рак молочной железы часто имеет низкую степень дифференцировки, лимфогенное метастазирование, низкие показатели общей выживаемости, высокочувствителен к герцептину и не чувствителен к гормонотерапии [Burriss H.A., et al., 2011, Theillet C., 2010, Valero V., et al., 2011].

Предложенная классификация остается актуальной до сих пор. Однако, имеются трудности в трактовке иммуногистохимических реакций, связанные с гетерогенностью опухоли, в которой сосуществуют клоны клеток, экспрессирующие разные маркеры и по-разному реагирующие на проводимую терапию [Laakso M., et al., 2006]. Экспрессия рецепторов ER, PR и HER2 в существенной степени вариабельно, и меняется в процессе предоперационной химиотерапии, может быть различной в различных участках опухоли (внутриопухолевая гетерогенность), кроме того первичная опухоль и метастазы (лимфогенные и гематогенные) могут существенно различаться по рецепторному статусу [Yang J., et al., 2012].

Несмотря на значительные успехи в определении, казалось бы, наиболее оптимального подхода к подразделению больных на группы на основании экспрессионных характеристик опухоли с целью определения дальнейшей тактики ведения таких пациенток, многое до сих пор остается не ясным. Лечение трижды-негативного рака, его прогноз, остается непонятным и очень вариабельным. Назначение

схем лечения НАХТ и адъювантной химиотерапии при лимфогенном метастазировании для люминального А и В рака также не определено. Группа люминального А типа рака включает случаи с разной склонностью к лимфогенному и гематогенному метастазированию. Проведение гормонотерапии у N₀ пациентов с люминальным А раком в ~15% случаев заканчивается гематогенным метастазированием. По сути, предсказать эффективность НАХТ в зависимости от молекулярных субтипов РМЖ не удастся [Rouzier R., et al., 2005].

Таким образом, актуальность настоящего исследования обусловлена неоднозначностью имеющихся в мировой литературе сведений о молекулярных механизмах, участвующих в реализации ответа опухоли молочной железы на химиотерапию и отсутствием внедренных в клиническую практику информативных маркеров прогноза и предсказания течения заболевания, которые позволяют устанавливать целесообразность проведения химиотерапии, осуществлять персонализированный выбор схем химиотерапии и прогнозирования ее эффективности.

1.2. Множественная лекарственная устойчивость и гены ABC-транспортеров

В настоящее время множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам считается одной из наиболее важных причин неэффективности терапии злокачественных новообразований. Множественная лекарственная устойчивость – вид лекарственной резистентности клеток опухоли, для которой свойственна широкая перекрестная устойчивость (кросс-резистентность) клеток к различным веществам, несходным по химической структуре и механизму действия, которая может индуцироваться одним или несколькими несходными по структуре веществами [Gottesman M.M., et al., 2002].

На сегодняшний день множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам является одной из наиболее важных причин неэффективности терапии злокачественных новообразований. Развитие МЛУ, связывают и с плохим ответом на химиотерапию и с плохим прогнозом [O'Driscoll L., et al., 2006, Szakacs G., et al., 2006].

Показано, что 75-80% случаев низкой эффективности химиотерапии при раке молочной железы (РМЖ) обусловлены лекарственной устойчивостью (ЛУ) опухоли [O'Driscoll L., et al., 2006, Szakacs G., et al., 2006], и в настоящее время рассматривают 3 главных механизма ЛУ в клетках:

1. Изменение экспрессии белков-переносчиков, которые обеспечивают поступление лекарств в клетки (2-5% случаев ЛУ).

2. Изменения в клеточном цикле, повышение активности репарации поврежденной ДНК, снижение апоптоза и изменение метаболизма лекарств (10-15%).

3. Повышение экспрессии энергозависимых белков-транспортеров лекарств, которые осуществляют выброс цитостатических препаратов из опухолевых клеток против градиента концентрации – собственно множественная лекарственная устойчивость (75-80%) [O'Driscoll L., et al., 2006, Schinkel A.H., et al., 2012, Szakacs G., et al., 2006].

Главный прорыв в раскрытии механизмов множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) произошел в 1976 году, когда была показана достоверная корреляция резистентности к химиопрепарату с чрезмерной экспрессией единственного белка, продукта гена *ABCB1*; также известного как Р-гликопротеин или *MDR1* [Juliano R.L., et al., 1976]. Высокая экспрессия *ABCB1* была связана с отсутствием ответа на химиотерапию при различных злокачественных новообразованиях, включая рак почки, печени и толстой кишки, а так же лимфомы, и при лейкемии [Ambudkar S.V., et al., 2003]. Несколько лет спустя был найден ген *ABCC1* (*MRP1*), который, как показали, играет роль в формировании лекарственной устойчивости при мелкоклеточном и немелкоклеточном раке легкого [Cole S., et al., 1992]. Кроме этого, высокий уровень экспрессии данного гена наблюдался и коррелировал с резистентностью к химиопрепаратам при раке простаты, раке легкого, в опухоли молочной железы, а так же при нейробластомах [Munoz M., et al., 2007]. Третьим ABC-транспортером лекарственных средств был обнаружен продукт гена *ABCG2* (также известный как *BCRP*), который осуществляет выброс химиопрепаратов из опухолевых клеток молочной железы [Austin Doyle L., et al., 2003, Robey R.W., et al., 2007]. Таким образом, наиболее часто МЛУ связывают с повышением экспрессии энергозависимых ABC-транспортеров (ATP-Binding Cassette) лекарств, которые осуществляют выброс цитостатических препаратов из опухолевых клеток против градиента концентрации с затратой энергии АТФ.

Семейство ABC-транспортеров (ATP-Binding Cassette), насчитывает 50 генов и наиболее известные из них: *ABCB1* -*MDR1* (multidrug resistance gene-1), *ABCC1* - *MRP1-3* (multidrug resistance-associated protein), *ABCG2* и *ABCG1*- *BCRP* и *BCRP1* (breast cancer resistance protein), т.е. главными подсемействами являются *ABCB*, *ABCC* и *ABCG* (рисунок 1) [Kerr I.D., et al., 2011]. Структурное строение всех представителей семейства является консервативным и объединено доменной организацией, которая включает в себя различные комбинации из двух функциональных субъединиц: TMD (transmembran ebinding domen) или MSD-трансмембранная субъединица, состоящая из шести спиралей, и

NBD (nucleotid binding domen) – субъединица, состоящая из двух доменов. Домены NBD носят название Walker A, он связывается с остатком фосфорной кислоты молекулы АТР, а второй содержит аспартат, связывается с магнием, ассоциированным с нуклеотидами, это Walker B домен [Lockhart A.C., et al., 2003, Szakacs G., et al., 2008, Szakács G., et al., 2009, Tusnády G.E., et al., 2006, Walker J.E., et al., 1982]. Все ABC-транспортеры по своей структуре подразделяются на полные и неполные (половинными). Полные характеризуются структурой (TMD-NBD)₂ и локализуются в плазматической мембране клетки. Транспортеры со структурой TMD-NBD называют неполными и находятся обычно на внутриклеточных мембранах (лизосомальных, митохондриальных, эндоплазматическом ретикулуме), единственным исключением является неполный протеин Abcg2 (он же Bcrp), локализованный и на плазматической мембране клетки [Rocchi E., et al., 2000, Tusnády G.E., et al., 2006].

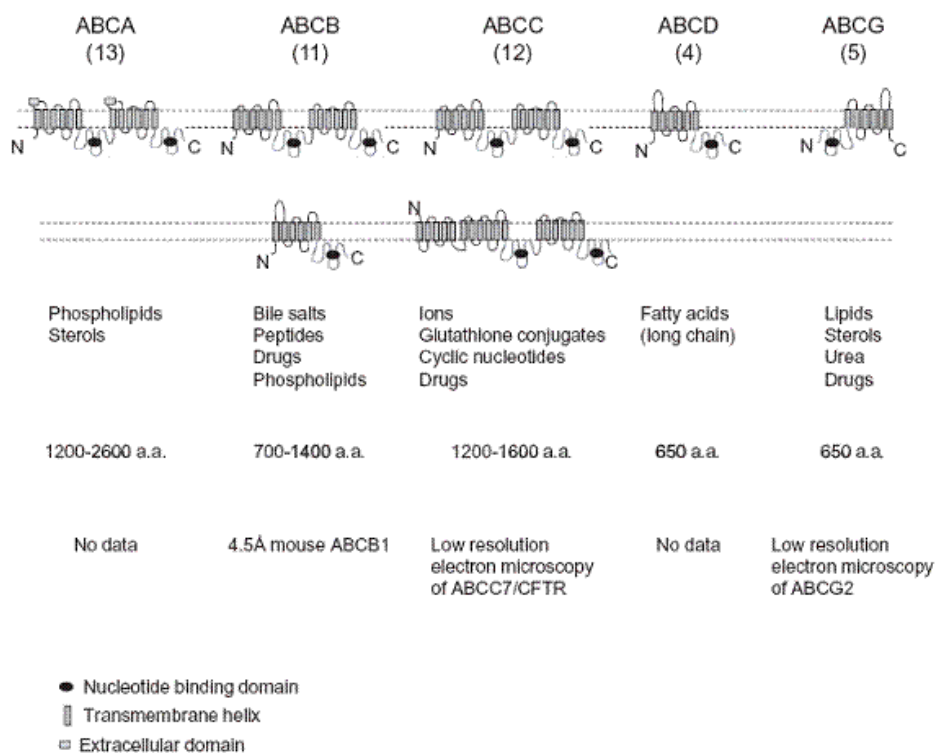


Рисунок 1. – Архитектура ABC-транспортеров человека [Kerr I.D., et al., 2011] Показаны пять подсемейств человеческих белков ABC-транспортеров с числом генов, идентифицированным в человеческом геноме (в круглой скобке). Трансmemбранную архитектуру показана схематически, с N-и C-концами последовательности. Приблизительное положение мембраны обозначено пунктиром. Под диаграммой указан спектр субстратов и диапазон размера белка (количество аминокислотных остатков).

Существуют два механизма (естественный или предсуществующий и приобретенный или адаптивный), благодаря которыми экспрессия генов ABC может привести к ЛУ клеток опухоли. Естественная или предсуществующая МЛУ свойственна клеткам опухоли

из-за высокой экспрессии генов ABC-транспортеров, существующей в нормальных тканях, из которых происходит опухоль. В этом случае химиотерапия малоэффективна. Было показано, что частота встречаемости гиперэкспрессии генов ABC-транспортеров зависит от типа опухоли и ее гистогенеза. Повышенная экспрессия наблюдается в опухолях, происходящих из тканей в норме экспрессирующих высокий уровень генов МЛУ, таких как нейробластома, астроцитомы, рак почек и надпочечников, гепатома, феохромоцитомы, и хорошо известно, что эти опухоли малочувствительны к химиотерапии [Leonard G.D., et al., 2003].

Приобретенная или адаптивная МЛУ клетки опухоли, чувствительные к химиотерапии, находятся в состоянии готовности к быстрой активации экспрессии генов ABC-транспортеров в ответ на химиотерапию. После проведения химиотерапии погибают чувствительные клетки, но промоторные и энхансерные участки генов ABC (например, *ABCB1*) оставшихся клеток увеличивают экспрессию, повышая резистентность к повторной химиотерапии [Scotto K.W., 2003]. Считается, что исследования, учитывающие спектр резистентности опухоли к химиопрепаратам, зависимый от генов ABC, являются наиболее перспективными для формирования подходов к индивидуальной лекарственной терапии опухолей [Dorai T., et al., 2004].

1.3 Экспериментальные исследования роли ABC-транспортеров в формировании фенотипа МЛУ

Уровень экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в эксперименте *in vitro* на линиях клеток опухоли молочной железы показал себя весьма однозначно. Роль всех ABC-транспортеров в формировании фенотипа МЛУ была доказана в опытах *in vitro* по их трансфекции в чувствительные к цитостатикам линии клеток и в экспериментах по индукции МЛУ на клеточных линиях при помощи химиопрепаратов [Allen J.D., et al., 2000, Gottesman M.M., et al., 2006, Hembruff S.L., et al., 2008, Kool M., et al., 1997]; [Allen J.D., et al., 2002, Chan H.S., et al., 1990, Deeley R.G., et al., 1997, Kampinga H.H., 1995, Raghun G., et al., 1996, Tew K.D., 1994].

В микроматричных и ПЦР-исследованиях Szakacs G., et al., (2004) была показана отрицательная корреляция экспрессии всех генов ABC в 60 раковых клеточных линиях с чувствительностью к 1429 различным химическим агентам (противоопухолевым препаратам и кандидатам на роль противоопухолевых средств) [Szakács G., et al., 2004]. Был проведен эксперимент, в котором исследовали связь между экспрессией ABC-транспортеров, их активностью и чувствительностью к химиотерапии. Для проведения

данного исследования Hembruff с коллегами использовал панель клеточных линий MCF-7, отобранных по устойчивости к различным химиотерапевтическим препаратам. Клеточные линии были резистентны к воздействию паклитаксела (MCF-7tax-2), доцетаксела (MCF-7txt), доксорубицина (MCF-7dox-2) и эпирубицина (MCF-7epi). Как показал ПЦР-анализ, уровень экспрессии гена *ABCB1* был существенно увеличен в клеточных линиях MCF-7tax-2, MCF-7txt, MCF-7epi, тогда как в клеточной линии, устойчивой к воздействию доксорубицина MCF-7dox-2, был повышен уровень *ABCC1* [Hembruff S.L., et al., 2008]. В другом исследовании экспрессию гена *ABCB1* оценили в доксорубицин-чувствительной и доксорубицин-устойчивой линиях мышей, по сравнению с экспрессией в нормальной ткани. Средний уровень экспрессии в чувствительной линии был сопоставим с нормальной тканью. В резистентных к доксорубицину клеточной линии было показано двукратное увеличение уровня мРНК *ABCB1*, по сравнению с нормальной тканью [Schinkel A.H., et al., 2012].

Таким образом, в исследованиях *in vitro* на клеточных линиях было установлено, что высокий уровень экспрессии генов ABC-транспортеров до воздействия химиопрепаратов, формирующий фенотип предсуществующей МЛУ, определяет устойчивость клеток к химиопрепаратам. При повышении экспрессии ABC-транспортеров формируется фенотип адаптивной МЛУ, которая, как было продемонстрировано в эксперименте, достаточно однозначно определяет устойчивость опухоли к химиотерапии. Вот два характерных эксперимента *in vitro* и *in vivo*:

Была оценена экспрессия генов *ABCB1*, *ABCC1* и *ABCG2* в клеточной линии рака молочной железы до и после обработки таксанами. Установлено статистически значимое повышение экспрессии генов после воздействия таксанов, т.е. формирование адаптивной МЛУ [Brooks T., et al., 2003]. В 2009 году было проведено исследование экспрессии ABC-транспортеров на модели мышей с наследственным раком молочной железы (*K14cre; Brca1F/F; p53F/F*). Возникающие у мышей опухоли изначально были чувствительны к действию цисплатина, доксорубицина, топотекана и карбоплатина. После нескольких курсов лечения этими химиопрепаратами опухоли становились к ним устойчивыми. В опухолевой ткани после терапии доксорубицином в пять раз, по сравнению с уровнем до лечения повышался уровень экспрессии гена *ABCB1*, кодирующего белок Р-гликопротеин, после терапии топотеканом увеличивалась экспрессия гена *ABCG2* [Pajic M., et al., 2009]. Эти данные свидетельствуют о формировании в изначально чувствительной опухоли адаптивной МЛУ, которая и определяла ее устойчивость к химиотерапии. Таким образом, в экспериментальных исследованиях достаточно четко доказана роль ABC-транспортеров

в формировании фенотипа предсуществующей и адаптивной МЛУ и их определяющую роль в устойчивости опухоли к действию химиопрепаратов.

1.4 Клинические исследования роли ABC-транспортеров в формировании фенотипа МЛУ

В отличие от экспериментов *in vitro* и *in vivo*, результаты клинических исследований, которые и должны были определить значение ABC-транспортеров в реализации ответа на химиотерапию, оказались весьма противоречивыми.

Клинические исследования значения ABC-транспортеров в формировании фенотипа МЛУ опухоли начались с 90-х годов прошлого столетия. Мы условно разделили эти работы на исследования клинической значимости уровня экспрессии ABC-транспортеров и предсуществующей МЛУ и изменения экспрессии ABC-транспортеров в процессе химиотерапии и адаптивной МЛУ в реализации устойчивости и чувствительности опухоли молочной железы к химиотерапии.

Высокий уровень экспрессии генов ABC в опухоли молочной железы до лечения коррелирует со степенью злокачественности, размером опухоли и отмечается при низкой степени дифференцировки опухолевых клеток. Однако, эти зависимости в значительной степени вариабельны и далеко не всегда наблюдаются при той или иной локализации, например при РМЖ [Fletcher J.I., et al., 2010]. В мета-анализе 2003 года было установлено, что уровень экспрессии Р-гликопротеина не коррелировал с лимфогенным метастазированием, рецепторным статусом, степенью злокачественности и размером опухоли молочной железы [Leonessa F., et al., 2003].

Многочисленные исследования стремились установить роль ABC-транспортеров в формировании МЛУ и связать их экспрессию до лечения или *предсуществующую МЛУ* с реакцией на химиотерапию. Исследования 26 у больных РМЖ опухоли с плохим ответом на НАХТ не показали экспрессию Р-гликопротеина до лечения [Dixon A., et al., 1992]. Испанские ученые изучали экспрессию генов и белков *ABCB1* и *MVP* у 52 больных РМЖ, которые получали 6 курсов НАХТ по схема FAC и CMF. Эффективность химиотерапии оценивали по шкале RECIST. Была обнаружена связь экспрессии генов *ABCB1* и *MVP* с лимфогенным метастазированием до и после НАХТ, но связь с ответом на химиотерапию так и была установлена [Schneider J., et al., 2001]. В исследованиях Faneyte I.F., et al., (2004) показано, что хотя и мРНК *ABCC1* - 3 была обнаружена в опухолях молочной железы всех пациентов, но связи с эффективностью НАХТ не установлена [Faneyte I.F., et al., 2004]. Кроме этого, Faneyte исследовал экспрессию гена *BCRP* (*ABCG2*) и его связь с

эффективностью химиотерапии по антрациклин-содержащим схемам. Никакой достоверной корреляции между уровнем экспрессии данного гена и эффектом терапии найдено не было [Faneyte I.F., et al., 2002].

Иммуногистохимические исследования 50 больных РМЖ показали связь экспрессии Р-гликопротеина до лечения с плохим ответом на НАХТ [Chintamani, et al., 2005]. Chang Shu Wang et al., (1997) было показано, что экспрессия гена *ABCB1*, коррелировала не только с резистентностью к НАХТ, но и с резистентностью к гормональной терапии РМЖ [Wang C.S., et al., 1997].

В ходе одного исследования ученые попытались связать уровни экспрессии всех генов МЛУ с клиническим результатом лечения пациентов. Park с коллегами при использовании микроматриц исследовал экспрессию 48 генов ABC в опухоли до лечения и связь с эффективностью неoadъювантной химиотерапии [Park S., et al., 2006]. Выборка включала 21 пациента с РМЖ, которые получали 4 курса химиотерапии по схеме 5-фторурацил, эпирубицин и циклофосфан (ФЕС). Больные были разделены на две группы: с наличием (Полная+Частичная регрессия) и отсутствием клинического ответа (Стабилизация+Прогрессирование) на неoadъювантную химиотерапию. С эффектом НАХТ связан как высокий, так и низкий уровень экспрессии ряда генов ABC до лечения [Park S., et al., 2006]. Ген *ABCC5* формировал резистентность к 5-фторурацилу и показал самый высокий уровень в группе пациентов без клинического эффекта НАХТ [Pratt S., et al., 2005].

Голландские ученые провели исследование уровня экспрессии 4-х ABC-транспортеров *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* у больных РМЖ до и после неoadъювантной химиотерапии. Группа пациентов включала в себя 59 человек, которые были разделены в зависимости от эффекта НАХТ. У 34 пациентов отмечался ответ на НАХТ и у 22 больных ответ на НАХТ отсутствовал. Статистически значимая связь с эффектом НАХТ отмечалась только для гена *ABCB1*. Ответ на НАХТ наблюдался при низком уровне экспрессии *ABCB1* до лечения, экспрессия остальных генов не коррелировала с ответом на НАХТ [Burger H., et al., 2003].

Chintamani, J. P. В 2005 году при исследовании экспрессии Р-гликопротеина в биопсии до лечения и в операционном материале после НАХТ 50 больных раком молочной железы показал значительную отрицательную корреляцию между уровнем экспрессии Р-гликопротеина в опухоли до лечения и ответом на НАХТ. экспрессия *ABCB1* в 70% (при n=50) опухолей молочной железы значительно увеличена по сравнению с нормальной тканью железы. Далее было показано для гена *ABCB1*, что изначально высокий уровень экспрессии данного гена сопряжен со слабым клиническим эффектом на

НАХТ. Уровень экспрессии гена *ABCB1* в опухоли 80 больных до лечения статистически не различался у отвечающих и не отвечающих на НАХТ пациентов [Singh L.C., et al., 2012].

В последнем исследовании 2013 года Kim с коллегами с помощью поликоличественного иммуногистохимического метода изучали экспрессию белков Р-гликопротеина, *Vscr* и *Mgp1* в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ. Уровень экспрессии белков до лечения не показал связи с эффектом НАХТ. Только у больных с полной морфологической регрессией уровень Р-гликопротеина был статистически значимо выше, чем у всех остальных пациентов, что вызвало у авторов существенное недоумение [Kim V., et al., 2013].

Результаты мета-анализов, которые по идеи должно были объединить все исследования и расставить все точки над «и» также оказались в значительной степени противоречивы. Мета-анализ В.Ж. Trock (1997), включающий 660 пациентов показал статистически значимую связь ($p < 0,001$) исходного уровня экспрессии Р-гликопротеина и эффекта НАХТ [Trock V.J., et al., 1997] к сожалению, в этом мета-анализе не проводили исследования на однородность выборки. Мета-анализы, проведенные позже в 2003 и 2005 годах не подтвердили данные мета-анализа 1997 года и не установили четкой связи экспрессии Р-гликопротеина до лечения с эффектом химиотерапии [Clarke R., et al., 2005, Leonessa F., et al., 2003]. Так в самом последнем мета-анализе 2005 года было обследовано 115 пациентов с высоким показателем однородности и показано, что у Р-гликопротеин положительных до лечения пациентов частота ответа на НАХТ не была выше, чем у Р-гликопротеин отрицательных больных, хотя надо сказать, что уровень значимости p достиг значения 0,088 [Clarke R., et al., 2005]. Эти данные поддержаны в обзоре Wind and Holen (2011), авторы которого говорят о гетерогенности клинической значимости экспрессии белков и генов АВС-транспортёров и сделали вывод о том, что четкая связь высокого уровня экспрессии АВС-транспортёров в опухоли молочной железы с устойчивостью к химиотерапии так и не была идентифицирована [Wind N., et al., 2011].

Таким образом множество литературных источников свидетельствуют о том, что в клинических условиях для рака молочной железы преобладающая множественная лекарственная устойчивость, обусловленная экспрессией АВС-транспортёров, не играет существенной роли в механизмах устойчивости опухоли к химиотерапии. И это, несмотря на множество данных *in vitro* о значении изначально высокой экспрессии АВС-транспортёров в резистентности клеток карциномы молочной железы (MCF7 и др.) к цитостатическим препаратам [Allen J.D., et al., 2000, Gottesman M.M., et al., 2006, Hembruff S.L., et al., 2008, Kool M., et al., 1997].

Приобретенная или адаптивная МЛУ, которую характеризует изменение экспрессии ABC-транспортеров в опухолевых клетках при воздействии химиопрепаратами также активно изучалась в плане связи с эффектом химиотерапии. Повышение экспрессии генов и белков МЛУ было не раз было продемонстрировано в работах *in vitro* на клеточных линиях, когда при обработке опухолевых клеток химиопрепаратами в них повышалась экспрессия ABC-транспортеров и это сочеталось с кросс-резистентностью. Есть также некоторые и клинические исследования в этом плане, хотя их значительно меньше, чем клинических исследований предсуществующей МЛУ [Fletcher J.I., et al., 2010, Kuo M.T., 2007, Leonessa F., et al., 2003, Wind N., et al., 2011].

В 2006 году было проведено масштабное микрочиповое исследование экспрессии ABC-транспортеров в опухолях молочной железы [Gillet J.P. S.J., Bertholet V., De Longueville F., Remacle J., Efferth T, 2006]. Предварительные результаты данного исследования показали, что из 41 исследуемого гена МЛУ, 38 генов чрезмерно экспрессируются либо в операционном материале опухоли молочной железы (после химиотерапии), либо до лечения. При этом для 23 генов ABC из 41, высокий уровень экспрессии наблюдался как до, так и после лечения. Таким образом, повышенная экспрессия большинства ABC-транспортеров является характерной чертой опухолей молочной железы, делают вывод авторы. Сравнение уровня экспрессии большинства генов ABC до и после проведения химиотерапии, показало, что статистически достоверных различий между ними нет. Только три гена *ABCC6/8/9* более высоко экспрессировались в образцах опухоли до лечения. Данный результат указывает на то, что эти гены могут принимать участие в формировании резистентности опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам. Дальнейшее исследование показало, что из трех вышеназванных генов существенную роль играет ген *ABCC6*. Высокая экспрессия этого гена придает опухолевым клеткам молочной железы устойчивость к таким химиопрепаратам, как этопозид, доксорубицин и даунорубицин, а так же к актиномицину D [Gillet J.P. S.J., Bertholet V., De Longueville F., Remacle J., Efferth T, 2006].

В последних исследованиях 2013 года рядом авторов представлены результаты по анализу профиля 49 генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы 68 больных после НАХТ и сделана попытка связать уровень экспрессии генов ABC с эффективностью химиотерапии и клиническими факторами [Hlavac V., et al., 2013]. Было показано, что экспрессия части генов до лечения статистически значимо выше по сравнению с нормальной тканью, среди которых *ABCC1* и *ABCG1*, у части генов экспрессия была ниже, чем в нормальной ткани, среди них *ABCB1*. Экспрессия остальных изученных генов у чешских авторов не отличалась от нормального уровня. Связь с эффектом показал

только ген *ABCA12*, у пациентов со стабилизацией и прогрессированием опухолевого процесса после НАХТ был значительно повышен уровень экспрессии гена *ABCA12* по отношению к нормальной ткани и по сравнению с группой пациентов, у которых наблюдалась частичная регрессия. Подобные исследования были проведены и ранее, в них высокий уровень экспрессии генов *ABCA12*, *ABCA1*, *ABCC5*, *ABCC13*, *ABCB6* и *ABCC11* после НАХТ был ассоциирован с отсутствием ответа на химиотерапию [Park S., et al., 2006].

Ассоциацию повышения экспрессии генов ABC с отсутствием эффекта НАХТ, подтверждают результаты исследования Chevillard et al., (1996) экспрессии гена *ABCB1* и его продукта в опухоли молочной железы при проведении НАХТ. Эти авторы, при помощи полуколичественной ПЦР и ИГХ, исследовали экспрессию *ABCB1* в опухоли молочной железы до лечения (0 сутки), на 8 и на 28 сутки после первого цикла НАХТ по схемам FAC и FТС. Если экспрессия *ABCB1* отсутствовала на 0, 8 и 28 сутки, то только 17% пациентов не отвечали на НАХТ. При экспрессии *ABCB1* на 0 сутки, 8 и на 28 сутки, только половина пациентов не отвечает на химиотерапию. Если *ABCB1* не экспрессировался на 0 сутки, но его экспрессия наблюдалась на 8 и/или 28 сутки (30 случаев из 73) или повышалась на 8 и/или 28 сутки (18 случаев из 73), то 90% пациентов не отвечали на химиотерапию [Chevillard S., et al., 1996].

Atalay в 2006 году показал, что у пациентов, у которых в процессе НАХТ индуцировалась экспрессия гена *ABCB1*, отсутствовал ответ на химиотерапию, и практически у всех пациентов, у которых не индуцировалась экспрессия *ABCB1* наблюдался ответ на химиопрепараты [Atalay S., et al., 2006].

Исследования экспрессии гена *ABCB1* в опухоли молочной железы и ее связи с эффективностью неоадьювантной химиотерапии показали ассоциацию высокого уровня экспрессии данного гена после лечения с отсутствием ответа на проведенную химиотерапию. Эти же авторы изучили экспрессию гена *ABCC1*, который, как полагают ученые, может служить прогностическим фактором эффективности предоперационной химиотерапии, а также безрецидивной выживаемости больных РМЖ. Они показали, что начальный высокий уровень экспрессии данного гена сопряжен с отсутствием ответа на химиотерапию и низкой выживаемостью [Burger H., et al., 2003].

Chintamani с коллегами (2005) показали, что до лечения экспрессия Р-гликопротеина наблюдалась у 52% больных РМЖ, после НАХТ по схеме FAC экспрессия Р-гликопротеина отмечалась в опухоли 73,5% пациентов [Chintamani, et al., 2005]. Singh и соавторы при исследовании 80 больных РМЖ, которые получали НАХТ по схеме CAF, продемонстрировали увеличение экспрессии гена *ABCB1* в опухоли молочной железы

после НАХТ, но уровень не различался у ответивших и неответивших на НАХТ пациентов [Singh L.C., et al., 2012]. В исследовании Rudas et al., (2003) отмечалось, что 54% опухолей больных РМЖ до лечения экспрессировали Р-гликопротеин, а под действием НАХТ положительными по экспрессии Р-гликопротеина становились 100% опухолей. Отмечалось также повышение частоты экспрессии генов *ABCC1* и *MVP* в опухолях молочной железы после НАХТ с 62% до 88% и с 66% до 97% соответственно [Rudas M., et al., 2003].

В мета-анализе В.Ж. Троцк, [1997] было продемонстрировано повышение экспрессии Р-гликопротеина в опухоли молочной железы в ответ на НАХТ [Troock V.J., et al., 1997]. В мета-анализе 2003 года было установлено, что больные слабо отвечали на лечение, если экспрессия Р-гликопротеина отмечалась и после НАХТ (адаптивная МЛУ) Было установлено, что начальная экспрессия Р-гликопротеина в опухоли молочной железы наблюдается в 40% случаев, в то время как после НАХТ частота экспрессии Р-гликопротеина увеличивается до 58%. [Leonessa F., et al., 2003]. Аналогичные данные показал и более поздний мета-анализ 2005 года: до лечения отмечается 46% Р-гликопротеин-положительных опухолей молочной железы, после лечения больных химиопрепаратами, которые являются субстратами Р-гликопротеина, частота Р-гликопротеин-позитивных опухолей увеличивается до 68%. При этом повышение экспрессии Р-гликопротеина коррелировало с отсутствием ответа на НАХТ [Clarke R., et al., 2005].

Прогностическое значение предсуществующей МЛУ, также как и связь с непосредственным эффектом химиотерапии – неоднозначна. Противоречивыми оказываются и данные по связи уровня экспрессии генов ABC с показателями выживаемости при РМЖ. В исследовании голландских ученых показано, что наибольший вклад в уменьшение показателей безрецидивной выживаемости больных РМЖ вносят гены *ABCB1* и *MVP*, повышенный уровень экспрессии которых ассоциирован с более высокой частотой рецидивирования и метастазирования (59 больных) [Burger H., et al., 2003]. По данным японских авторов (43 больных РМЖ) экспрессия генов *ABCC1*, *MVP*, *ABCG1* до лечения не имеет прогностической значимости и не связана с основными клинико-морфологическими параметрами прогноза [Kanzaki A., et al., 2001]. При изучении 171 больной РМЖ было показано, что экспрессия *ABCB1* и *ABCC1* в опухоли до лечения не имеет корреляций с 5-ти летней выживаемостью пациентов [Moureau-Zabotto L., et al., 2006]. Другими авторами, в частности, N.S.Wind и I.Holen, в 2011 году, тоже не было показано статистически значимой корреляции экспрессии гена *ABCB1* с 5-летней безрецидивной выживаемостью.

Экспрессия гена *ABCC11* была обнаружена во многих опухолях, и в частности, в Ропухоли молочной железы, и даже предложена некоторыми авторами в качестве прогнозирующего фактора для выбора химиотерапии [Honorat M., et al., 2008]. Исследование экспрессии Р-гликопротеина, Mrp1 и Vsgp белков в опухоли 45 больных РМЖ до предоперационной химиотерапии не выявили связь с безметастатической выживаемостью [Kim B., et al., 2013].

В исследовании голландских ученых показано, что наибольший вклад в уменьшение показателей безметастатической выживаемости больных РМЖ вносят гены *ABCB1* и *MVP*, повышенный уровень экспрессии которых ассоциирован с более высокой частотой рецидивирования и метастазирования (59 больных) [Burger H., et al., 2003]. При изучении 171 больной РМЖ было показано, что экспрессия *MDR1* (*ABCB1*) и *MRP1* (*ABCC1*) не имеет корреляций с 5-ти летней выживаемостью пациентов [Moureau-Zabotto L., et al., 2006].

Исследования 104 пациентов, которым проводилась операция и адьювантное лечение, показало, что чем большее количество опухолевых клеток в операционном материале экспрессируют Р-гликопротеин, тем хуже у больных общая и безметастатическая выживаемость [Surowiak P., et al., 2005]. Недавние исследования на выборке из 100 больных раком молочной железы указывают на отсутствие прогностической значимости генов ABC, в частности *ABCA12*, *ABCA13*, *ABCC1*, *ABCC8*, *ABCC11* и *ABCD2* [Hlavac V., et al., 2013]. Повышенный уровень экспрессии гена *ABCC2* в операционном материале 70 больных без НАХТ был связан с плохой общей и безметастатической выживаемостью [Maciejczyk A., et al., 2012]. Ретроспективное ИГХ исследование 177 пациентов не выявило связи экспрессии Р-гликопротеина с общей и безметастатической выживаемостью, экспрессия *ABCC1* была связана с неблагоприятным прогнозом только в подгруппе больных с III степенью злокачественностью [Larkin A., et al., 2004]. Данные ИГХ исследования белка Mrp1 у 259 больных не показали связи с общей и безметастатической выживаемостью [Nooter K., et al., 1997]. Исследование 516 больных РМЖ в состоянии пременопаузы показало, что высокий уровень экспрессии белка Mrp1 в операционном материале только у больных, получавших адьювантную химиотерапию (но не гормональную терапию), был связан с неблагоприятным прогнозом [Filipits M., et al., 2005].

Таким образом, казавшийся очевидным тезис о том, что высокий уровень экспрессии генов ABC и их продуктов в опухолевых клетках обеспечивает устойчивость к химиопрепаратам и является неблагоприятным прогностическим фактором, в клинических исследованиях, по крайней мере, для РМЖ, до сих пор является весьма

спорным. Подтверждением тому служит и неудача в разработке многочисленных ингибиторов функциональной активности ABC-транспортёров, клинические исследования которых не дали повышения чувствительности опухоли к химиотерапии и увеличение выживаемости онкологических больных [Tamaki A., et al., 2011].

Что касается связи приобретенной МЛУ с показателями выживаемости больных РМЖ, то таких исследований на настоящий момент они единичны: Wind и Holen показали, что повышение экспрессии *ABCC1* в процессе лечения по антрациклин-содержащим схемам коррелировало с более низкой безрецидивной выживаемостью [Wind N., et al., 2011]. После НАХТ экспрессия белка *Vscr* в опухоли 45 больных РМЖ коррелировала с безметастатической выживаемостью [Kim B., et al., 2013].

Таким образом, наибольший интерес представляют так называемые "адаптационные изменения" или адаптивная МЛУ, характеризующаяся изменением экспрессии ABC-транспортёров в опухоли при проведении химиотерапии. В клинической опухоли происходит активный процесс формирования МЛУ, на который оказывают влияние факторы организма и опухоли.

1.5 Характеристика отдельных подсемейств ABC-транспортёров

Подсемейство ABCB и ген ABCB1

Субсемейство ABCB включает 11 белков, его представители могут быть как полными транспортёрами (*ABCB1*, *ABCB4*, *ABCB11*), локализованными в апикальной части плазматической мембраны клетки, так и половинными (*ABCB2*, *ABCB3*, а также транспортёры митохондриальной мембраны *ABCB6*, *ABCB7*, *ABCB8* и *ABCB10*, транспортёр лизосомальной мембраны *ABCB9*) [Tusnády G.E., et al., 2006].

Самым известным представителем данного подсемейства является ген *ABCB1* (*MDR/PGY1*, Р-гликопротеин) ATP-Binding Cassette, Sub-Family B (*MDR/TAP*), Member 1. Ген *ABCB1* локализован в длинном плече 7 хромосомы (7q21.12). Белок Р-гликопротеин состоит из 1280 аминокислот, имеет 2 АТФ-связывающих участка и 12 трансмембранных доменов, образующих в мембране поры, через которые осуществляется выброс цитотоксических веществ из клетки. Он локализован на цитоплазматической мембране, а также на мембранах Гольджи и эндоплазматического ретикулума. Р-гликопротеин был впервые обнаружен в исследовательской лаборатории группой ученых под руководством Juliano и Ling в плазматической мембране резистентных клеток в 1976 году [Juliano R.L., et al., 1976].

У про- и эукариотов Р-гликопротеин выполняет роль энергозависимого насоса, участвуя в транспортировке разнообразных низкомолекулярных соединений через клеточную мембрану [Gottesman M.M., 2002]. Известно, что Р-гликопротеин как АТФ-зависимый транспортный белок, может выводить из клетки против концентрационного градиента в основном липофильные вещества, принадлежащие к разным классам химических соединений – антрациклины, алкалоиды барвинка розового, эпиподофиллотоксины, стероидные гормоны, разные пептиды, цитокины, продукты метаболизма клетки [Ahmed F.E., 2005, Ambudkar S.V., et al., 2003, Gottesman M.M., 2002, Raghu G., et al., 1996, Yasuhisa K., et al., 2007]. Кроме этого, на клеточных культурах, резистентных к лекарственным препаратам, было продемонстрировано, что продукт гена *ABCB1* участвует в транспорте разнообразных химиопрепаратов, таких как колхицин, доксорубин, адриамицин, винбластин, дигоскин и паклитаксел, таксотер, цисплатин и др.

Выраженность экспрессии Р-гликопротеина в различных тканях не равномерна, высокие показатели обнаруживаются в тканях активно контактирующих с ксенобиотиками: в печени, почках, слизистой тонкого и толстого кишечника, а так в ткани надпочечников, эндотелии капилляров головного мозга, яичках, трофобласте плаценты [Fojo A., et al., 1987]. Крайне низкий уровень экспрессии белка обнаруживается в легких и клетках эпидермиса. В костном мозге CD34-положительные клетки экспрессируют функционально активный Pgp, затем по мере созревания клеток миелоидного ряда постепенно снижается экспрессия и функциональная активность этого белка [List A.F., 1996]. Опухоли, происходящие из Pgp-экспрессирующих клеток, будут обладать предсуществующей МЛУ. Р-гликопротеин участвует в формировании гематоэнцефалического барьера [Rao V.V., et al., 1999]. Р-гликопротеин локализованный в трофобласте плаценты играет большую роль не только в ограничении действия на плод лекарственных веществ и токсинов, но и необходим для нормального развития и поддержания физиологических функций плаценты [Hutson J.R., et al., 2010].

К развитию резистентности может приводить как изменение экспрессии гена *ABCB1*, так и амплификация участка генома, содержащего ген *ABCB1* и еще пять-шесть сцепленных с ним генов. Механизмы развития устойчивости были изучены в нескольких исследованиях по изучению селекционно выведенных устойчивых сублиний клеток китайского хомяка *Cerb-1* и *Cerb-2* и линии *CHLV-79RJK* [Flahaut M., et al., 2006, Katoh H., et al., 2005, Pang E., et al., 2005, Van Dekken H., et al., 2008]

Подсемейство *ABCC* и гены *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5* Подсемейство *ABCC* содержит 13 транспортеров, основная функция которых заключается в транспорте ионов и

секреции широкого спектра токсинов. Продукты данных генов состоят из двух трансмембранных доменов, каждый из которых состоит из 6 сегментов, образующих пору в мембране. Кроме этого имеется два нуклеотидных домена. Отличительной чертой *ABCC1*, 2 и 3 является наличие дополнительного аминокислотного остатка, содержащего 5 трансмембранных сегментов [Schinkel A.H., et al., 2012].

Ген *ABCC1* ATP-Binding Cassette, Sub-Family C (*CFTR/MRP*), Member 1 локализован в коротком плече 16 хромосомы (16p13.11). Белок *Abcc1* или *Mgp1* был открыт в 1992 году Cole et al. в клеточных линиях рака легкого, устойчивых к доксорубину [Toyoda Y., et al., 2008]. Это трансмембранный белок, расположенный на базолатеральной поверхности клеток. Большинство химиотерапевтических препаратов, которые транспортируются подсемейством *ABCC*, являются крупными реакционными молекулами, которые поступают в клетки посредством простой диффузии. Несмотря на сходство и перекрытие со специфичностью субстратов *ABCB1*, *ABCC1* транспортирует более широкий диапазон ксенобиотиков, используемых как терапевтические препараты, включая антимаболиты фолиевой кислоты, антрациклины, алкалоиды барвинка, антиандрогены, глутатион (GSH), препараты мышьяка и сурьмы, метотрексат [Cole S.P., et al., 1994, Deeley R.G., et al., 1997, Rajic M., et al., 2009].

ABCC1 широко экспрессирован в эпителиальных клетках организма, включая пищеварительную, мочеполовую и дыхательную системы, в эндокринных железах и органах кроветворения, в том числе во всех клетках периферической крови, независимо от их дифференцировки [Chang J.C., et al., 2003, Flens M.J., et al., 1996]. Гиперэкспрессию белка в эпителии бронхов некоторые исследователи считают одним из механизмов развития бронхиальной астмы [Loe D.W., et al., 1996]. Высокий уровень экспрессии обнаружен во многих опухолевых клетках при раке легких, толстого кишечника, молочной железы, мочевого пузыря, простаты, а также при лейкозах [Chang J.C., et al., 2003, Nuh H.J., et al., 2006].

Вторым важным представителем данного подсемейства транспортеров является *ABCC2*, открытый Paulusma et al. в 1996 году, как канальный мультиспецифический транспортер органических анионов (canalicular Multispecific Organic Anion Transporter (сМОАТ)), а Evers et al. (1998) определил сМОАТ как белок ABC (Multidrug resistance-associated protein 2 (*MRP2*)) и изучил его экспортную активность лекарственных средств в трансформированных клетках почки [Paulusma C.C., et al., 1996]. *Mgp2* является переносчиком глюкуронидов билирубина в желчи, мутации в гене либо снижение экспрессии этого белка известен как синдром Дабина-Джонсона [Paulusma C.C., et al., 1996]. Ген *ABCC2* локализован в длинном плече 10 хромосомы (10q24.2).

Исследования продемонстрировали, что *Abcc2* участвует в транспорте органических анионов, является переносчиком веществ, конъюгированных с глутатионом, глюкуроновой и серной кислотами [Lockhart A.C., et al., 2003]. В настоящее время проводятся активные исследования по изучению связи экспрессии *ABCC2* с течением рака молочной железы. С помощью иммуногистохимического исследования было показано, что выделяют два типа *Abcc2* протеина: расположенный в цитоплазматической мембране и цитоплазме опухолевых клеток (*Abcc2c*) и локализованный в оболочке ядра атипичных клеток (*Abcc2n*). Согласно результатам исследований следует, что опухоли с гиперэкспрессией белка в обеих локализациях характеризуются худшим прогнозом. Если белок расположен в оболочке ядра, то, по сравнению с локализацией *Abcc2* на цитоплазматической мембране, опухоли имеют более агрессивную клиническую картину течения заболевания [Maciejczyk A., et al., 2012].

ABCC2 может являться причиной резистентности опухолевых клеток к метотрексату, цисплатину, этопозиду, доксорубину, эпирубину, винкристину и митоксантрону [Cole S.P., et al., 1994, Maciejczyk A., et al., 2012]. В целом спектр резистентности совпадает с таковым у *ABCC1* за одним исключением: *ABCC2* индуцирует резистентность к цисплатину, чего не наблюдается у *ABCC1* обеспечивает устойчивость и к препаратам группы камптотецинов [Borst P., et al., 2002].

ATP-binding cassette, subfamily C, member 5; *ABCC5*. Хромосомное месторасположение: 3q27.1. Альтернативные названия: *Multidrug resistance-associated protein 5 (MRP5)*. Этот трансмембранный белок содержит 1437 аминокислотных остатка и состоит из 12 трансмембранных доменов. Высокая экспрессия наблюдается в скелетной мускулатуре, а также мозге, почках, яичниках, и сердце [Belinsky M.G., et al., 1998]. У мышей *ABCC5* преимущественно экспрессирован в мозге, в значительной степени экспрессируется в половых железах, плаценте, легких и желудке. *ABCC5* локализуется преимущественно в базальной мембране, а так же внутри и вокруг эмбриональных сосудов. Продукт гена *ABCC5* обнаружен в астроцитах подкоркового белого вещества и в структуре пирамидальных нейронов [McAleer M.A., et al., 1999, Nies A., et al., 2004]. Гиперэкспрессия *Mgp5* приводит к резистентности к тиопуринам, таким как 6-меркаптопурин и тиогуанин, используемым для лечения острого лимфобластного лейкоза и острого миелоидного лейкоза, к анионным флуорохромам и к тяжелым металлам, может ингибироваться сульфоперазоном и бензбромароном [McAleer M.A., et al., 1999]. Oguri et al. (2000) отметил, что эффективность препаратов платины в лечении рака лёгкого ограничена при экспрессии *ABCC5*. Экспрессия гена *ABCC5*, увеличена в нормальной ткани и в ткани опухоли легкого, после лечения препаратами платины.

Однако, обработка цисплатином *in vitro* клеток рака легкого, или мононуклеарных клеток карбоплатином, не вызывает увеличение экспрессии *ABCC5* [Oguri T., et al., 2000].

Подсемейство ABCG и гены ABCG1 и ABCG2 Подсемейство *ABCG* содержит шесть транспортеров, которые имеют NBD сегмент на N-конце. *ABCG2* функционирует как гомодимер [Schinkel A.H., et al., 2012]. Ген *ABCG1* (ATP-binding cassette, subfamily G, member 1) локализован в 21 хромосоме 21q22.3. Альтернативные названия: *Breast cancer resistance protein 1 (BCRP1)*.

Главная физиологическая функция белка *Abcg1* – поддержание липидного гомеостаза тканей организма, особенно в легких, центральной нервной системе и сосудах. Помимо этого данный белок участвует в секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы, контролирует пролиферацию гемопоэтических стволовых и мультипотентных клеток-предшественников, как в костном мозге, так и мобилизует их в селезенке при экстрамедуллярном кроветворении. Нарушение функции *ABCG1* приводит к развитию атеросклероза, способствуя избыточному накоплению липидов в макрофагах и формированию пенистых клеток. Мутации гена *ABCG1* сопровождаются повышением риска развития сахарного диабета 2-го типа [Hirayama H., et al., 2013, Kerr I.D., et al., 2011, Matsuo K., et al., 2011, Matsuo M., 2009, Westerterp M., et al., 2014, Ye D., et al., 2011].

Продукт гена *ABCG1* экспрессирован на поверхности клетки и во внутриклеточных компартментах клетки. Jakobsson et al. (2009) идентифицировал GPS2 как корегулятор, необходимый для экспрессии *ABCG1*. Yvan-Charvet et al. (2010) показал, что *ABCA1* и *ABCG1* ингибируют пролиферацию гемопоэтических стволовых и мультипотентных клеток [Jakobsson T., et al., 2009, Yvan-Charvet L., et al., 2010].

Продукт гена *ABCG1* способен к выведению из опухолевой клетки гидрофобных химиотерапевтических агентов, гидрофильных органических анионов, антрациклинов, таксанов и алкалоидов Барвинка [Gottesman M.M., et al., 2002, Polgar O., et al., 2006, Zhou L., et al., 2008]. Что касается локализации, *ABCG1* проявляет высокую активность в апикальной мембране плацентарного синцитиотрофобласта, эпителия кишечника, канальцев печени, и мозговых капилляров [Austin Doyle L., et al., 2003]. Кроме того, *ABCG1* в апикальной мембране эпителия протоков молочной железы способствует выведению ксенобиотиков и витаминов в грудное молоко [van Herwaarden A.E., et al., 2007].

Ген *ABCG2* (ATP-binding cassette, subfamily G, member 2), локализован в 4 хромосоме 4q22.1. Альтернативные названия: *Breast cancer resistance protein (BCRP)*. Белок состоит из 663 аминокислотных остатков. Физиологические функции *Bcrp* состоят в обеспечении защиты тканей от эндогенных токсинов или ксенобиотиков и регулировании

клеточного гомеостаза физиологически важных эндогенных соединений, таких как гем, порфирины, рибофлавин, и эстрогены, играет роль в гомеостазе фолиевой кислоты [Austin Doyle L., et al., 2003]. Doyle с коллегами (2003) обнаружили, что экспрессия гена *ABCG2* в клетках рака молочной железы придает им устойчивость к антрациклинам, митоксантрон, доксорубицину, даунорубицину и топотекану [Austin Doyle L., et al., 2003]. Мыши, испытывающие недостаток в продукте гена *ABCG2*, чрезвычайно чувствительны к продукту деструкции хлорофилла феофобиду-а [Schinkel A.H., et al., 2012]. Данный недостаток может заканчиваться тяжелыми, иногда летальными фототоксическими поражениями, подвергнутой воздействию свету, кожи.

Экспрессия гена *ABCG2* наблюдается в плаценте, тонкой и толстой кишке (самый высокий уровень в двенадцатиперстной кишке, самый низкий в прямой кишке), центральной нервной системе, печени, надпочечнике, простате, яичках, матке, желудке, легких и почках [Gutmann H., et al., 2005, Maliepaard M., et al., 2001]. В пределах почек и толстой кишки, *ABCG2* экспрессируется в апикальной мембране эпителиоцитов [Huls M., et al., 2008, Maliepaard M., et al., 2001]. В гематоэнцефалическом барьере, и плацентарных синцитиотрофобластах, продукт гена *ABCG2* локализуется там, где транспорт вредных субстратов через эти барьеры ограничен [Maliepaard M., et al., 2001, Zhang W., et al., 2003]. Например, экспрессия *ABCG2* выражена на внутрисполостной стороне мозговых капилляров [Zhang W., et al., 2003].

Ген MVP Major vault protein (MVP). Локализован в коротком плече 16 хромосомы 16p11.2. Альтернативное название: Lung resistance-related protein (*LRP*). *Vault* - внутриклеточные органеллы размером приблизительно 57 на 32 нм. Они включают в себя РНК и белок, кодируемый геном *MVP* (молекулярная масса 100 кДа). MVP составляет более чем 70% массы частицы [Kickhoefer V.A., et al., 1999]. Выделенный белок MVP имеет в своем составе 896 аминокислот, и на 88% идентичен белку MVP крысы.

Высокая экспрессия *MVP* была обнаружена в эпителиальном покрове бронхиол, верхнем и нижнем отделах пищеварительного тракта, почечных трубочках, эпидермальных кератиноцитах и меланоцитах, макрофагах, и коре надпочечников. Низкий и переменный уровень был обнаружен и в других тканях организма. *MVP* экспрессируется во всех типах опухолей легкого [Izquierdo M.A., et al., 1996].

Kickhoefer et al. (1998) обнаружил, что экспрессия *MVP* увеличилась в 15 раз в нескольких резистентных к лекарственным средствам клеточных линиях [Kickhoefer V.A., et al., 1998]. Участие *MVP* в формировании МЛУ показал Kitazono с коллегами [Kitazono M., et al., 2001]. При увеличении уровня экспрессии *MVP* в клетках рака толстой кишки, клетки опухоли приобретали резистентность к доксорубицину, этопозиду и таксолу.

Однако, экспрессия *MVP* в овариальной клеточной линии рака A2780 приводит к увеличению количества органелл-vault, но не вызывает резистентности к лекарственным препаратам [Siva A.C., et al., 2001].

1.6 Регуляция экспрессии ABC-транспортеров

Исследования механизмов регуляции генов МЛУ важны как с точки зрения понимания процессов формирования фенотипа множественной лекарственной устойчивости в опухоли, так и с точки зрения возможности разработки на их основе факторов прогноза развития МЛУ при проведении химиотерапии. Разнообразные генетические и эпигенетические регулирующие механизмы составляют плотно скоординированную сеть, которая определяет формирование фенотипа МЛУ в опухоли.

Достаточно много известно про внутриклеточные и генетические механизмы регуляции транскрипционной активности ABC-транспортеров в условиях клеточных опухолевых культур. Было показано, что практически все гены ABC являются индуцибельными генами, и их транскрипционная активность возрастает в ответ на самые разные стрессорные воздействия, включающие, влияние химиотерапевтических препаратов, химических канцерогенов, гипоксии, некоторых цитокинов (ФНО α , ИЛ6), белков теплового шока, агентов, индуцирующих дифференцировку и т.д. (рисунок 2) [Chen K.G., et al., 2012, Sui H., et al., 2012, Weinstein-Oppenheim C.R., et al., 2001]. Было высказано предположение о том, что изменение (повышение или снижение) экспрессии генов ABC в ответ на воздействие химиопрепаратов – является отражением индивидуального паттерна регуляции генов ABC свойственный конкретному пациенту и его опухоли.

Различные **сигнальные каскады** опухолевых клеток и **внутриклеточные мессенджеры** участвуют в регуляции генов ABC-транспортеров. В работе Vicky Goler-Baron (2012) на клеточной линии рака молочной железы MCF-7 была показана роль сигнального пути PI3K/Akt/PTEN/mTOR в регуляции экспрессии генов *ABCC1* и *ABCG2* [Goler-Baron V., et al., 2012]. Активация Raf/MEK/ERK, MAPK и JNK проводящих путей, которая может быть вызвана химиотерапией, индуцирует экспрессию генов ABC-транспортеров [Sui H., et al., 2012, Weinstein-Oppenheim C.R., et al., 2001]. В регуляции активности Р-гликопротеина также принимают участие протеинкиназа С, протеинкиназа А и другие протеинкиназы [Sui H., et al., 2012]. Отмечена одновременная экспрессия *ABCB1* с другими генами, принимающими участие в канцерогенезе, такими, как антиапоптотические гены *BCL2* и *BCL-XL* [Schinkel A.H., et al., 2012]. Учитывая

множественность активности и механизмов *ABCB1/Pgp*, можно сделать вывод, что эта транспортная система крайне необходима для нормального функционирования клетки, и именно поэтому ее регуляция неоднократно продублирована [Stavrovskaya A., 2000].

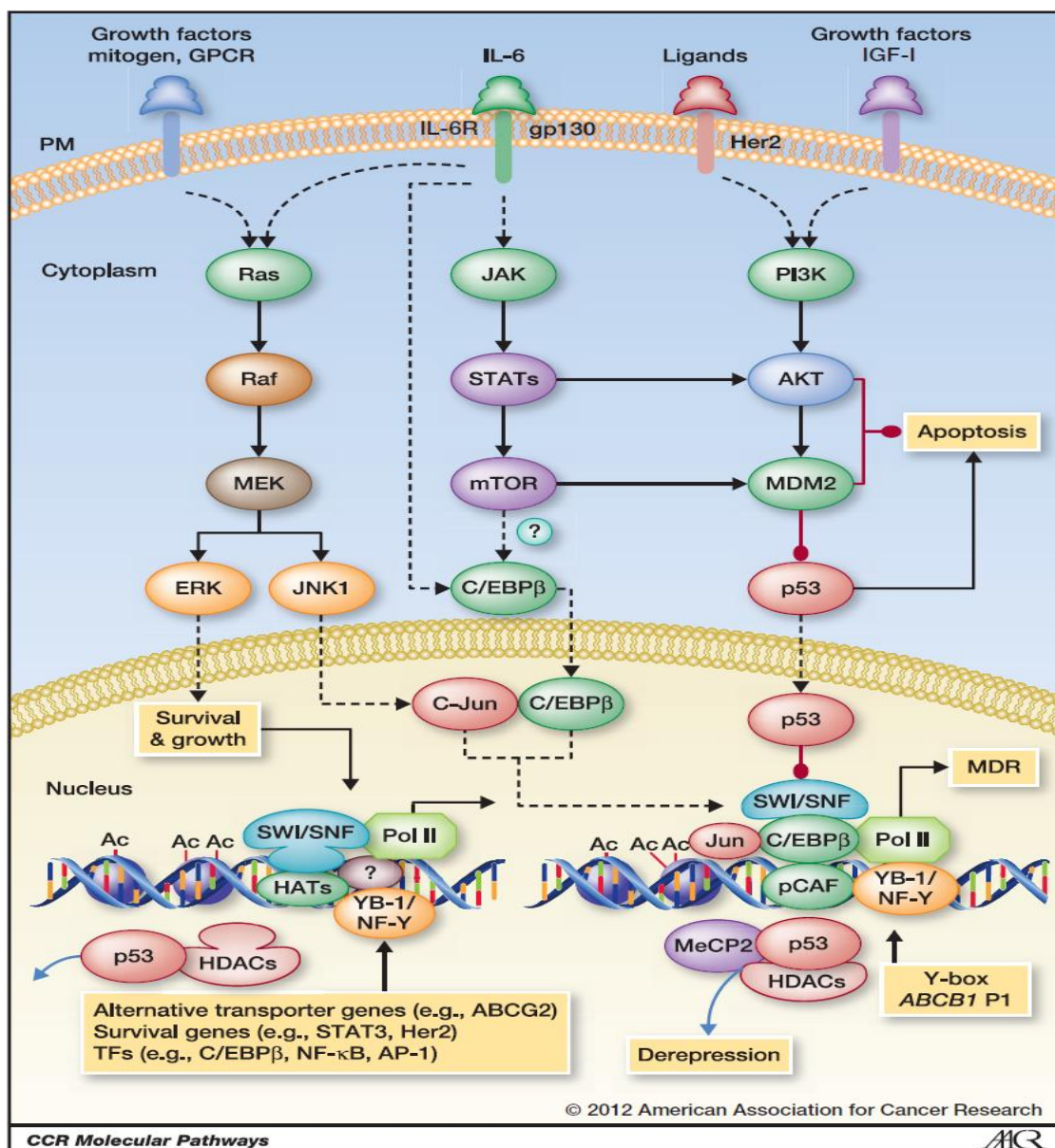


Рисунок 2. – Кооперация и координация сигнальных путей индукции МЛУ. МЛУ индуцируют сигналы, которые имеют плеiotропные эффекты и приводят к трансаkтивации и координации различных программ МЛУ. Система активации экспрессии генов АВС включает p53 сигнальный каскад, антиапоптоические проводящие пути, Janus-активизированные киназы (JAK) / датчик сигнала и активатор транскрипции (STAT -проводящие пути), Ras-активизированные митогеном протеинкиназы (МАРК) проводящие пути и другие механизмы [Chen K.G., et al., 2012]. Черные стрелки указывают на активацию или положительное регулирование, тогда как красные линии обозначают супрессию или отрицательное регулирование. Вопросительные знаки указывают гипотетические или неопределенные факторы или проводящие пути. Обозначения: Ac, ацетилированный гистон; AP 1, активаторный белок 1 (транскрипционный фактор); c-Jun, фактор транскрипции закодирован протоонкогеном c-Jun; ERK, внеклеточная отрегулированная сигналом киназа; gp130, гликопротеид 130; GPCR, G - соединенный с белком рецептор; IGF-I, инсулиноподобный фактор роста I; IL-6R, рецептор IL-6; JNK1, c-jun-N-terminal киназа; MEK, киназа МАРК-ERK; pCAF, p300/CBP-associated фактор; PI3K, phosphoinositide c 3 киназами; PM, плазматическая мембрана; Pol, РНК полимеразa; Raf, протоонкоген serine/threonine-protein киназа; Ras, белковое подсемейство маленьких ГТФ-аз; TF, транскрипционный фактор.

Ядерный транскрипционный фактор NF-κB может действовать как транскрипционный фактор гена *ABCB1*. Благодаря мутациям гена NF-κB и хромосомным аномалиям локуса может быть дополнительно активизирована его экспрессия в опухолевых клетках [Ogretmen B., et al., 1999]. NF-κB играет двойную роль в регулировании *ABCB1*, как промежуточное звено для быстрой активации в ответ на стресс и ген-репрессор транскрипции в клетках, которые были хронически подвергнуты воздействию токсических средств, вызывая апоптоз [Ogretmen B., et al., 1999, Wang W., et al., 2003]. ФНОα может регулировать активность генов ABC через NF-κB [García M.G., et al., 2005].

В регуляцию генов ABC вовлечены и *микро РНК*. В обзорах 2010 года была освещена важная роль таких микроРНК как miR-21 и miR-214, miR-28, miR-451, miR-206 в регуляции генов *ABCB1* и *ABCG2* [Ma J., et al., 2010], а также miR-328, которая негативно регулирует экспрессию *ABCG2*, miR-326 регулирует экспрессию гена *ABCC1* [Liang Z., et al., 2010, Pan Y.-Z., et al., 2009, Zheng T., et al., 2010]. Должно быть принято во внимание и то, что во многих случаях экспрессия генов ABC обратно пропорциональна уровню экспрессии нескольких микроРНК. В свою очередь, ингибция активности микроРНК может быть модулирована химиотерапевтическими препаратами через повреждение ДНК, деметилирование ДНК, что может быть связано с быстрым изменением уровней микроРНК в опухолевых клетках [Hu H., et al., 2011, Iorio M.V., et al., 2012].

Ген *ABCB1* имеет две промоторные области – нижний и верхний промоторы, при этом активность гена регулируется преимущественно нижним промотором [Ueda K., et al., 1987]. На активность промотора *ABCB1* могут *влиять гены TP53*, *ras*, *raf*, RAR-альфа и RAR-бета (гены рецепторов ретиноевой кислоты) [Chin K.-V., et al., 1992, Stavrovskaya A., 2000]. Кроме этого, регуляция экспрессии генов ABC может осуществляться факторами транскрипции *c-jun* и *c-fos*, STAT, JAK, NF-κB, которые зачастую очень активны в опухолевых клетках [Bhushan A., et al., 1992, Dorai T., et al., 2004, Stavrovskaya A., 2000]. Весьма известным фактом является, то, что с промоторным регионом гена *ABCB1*, одного из самых важных генов МЛУ, связывается продукт гена-супрессора опухолевого роста дикого типа p53 и ингибирует транскрипцию *ABCB1* [Johnson R.A., et al., 2001, Thottassery J.V., et al., 1997]. При изучении лекарственной устойчивости клеточных линий рабдомиосаркомы и нейробластомы было обнаружено, что p53 является мощным ингибитором функции Р-гликопротеина и *ABCC1* [Chen K.G., et al., 2012, Goldstein L., 1996]. При изучении МЛУ рака предстательной железы была обнаружена корреляция между понижением степени дифференцировки опухоли и увеличением экспрессии *ABCC1*

и мутантного белка p53, сочетание этих двух механизмов привело к развитию резистентности опухоли к доксорубицину и винбластину [Goldstein L., 1996, Sullivan G.F., et al., 2000, Van Brussel J.P., et al., 2001]. В системе *in vitro* было четко показано, что мутантный p53 стимулирует экспрессию *ABCB1* и выступает в качестве онкогена [Sampath J., et al., 2001]. Некоторые типы мутаций p53 в состоянии активировать промотор *ABCB1* [Chin K.V., et al., 1992, Dittmer D., et al., 1993] или подавлять его способность ингибировать транскрипцию *ABCB1*. Высокий уровень экспрессии p53 может быть индуцирован химиопрепаратами из-за повреждения ДНК в опухолевых клетках. Однако, у более чем 50% опухолей ген *TP53* мутирован, при раке молочной железы частота мутаций *TP53* составляет 25% [Soussi, et al., 2007, Soussi, et al., 2005, Olivier, et al., 2010]. Чаше мутации *TP53* встречаются в поздней стадии РМЖ или в более агрессивных подтипах, таких как тройной негативный или HER2-позитивный рак молочной железы [Langerod A., et al., 2007].

Снижение активности белка опухолевого супрессора Pten за счет нарушений в гене *PTEN* часто наблюдается в опухолях различных локализаций. Было показано, что мутация *PTEN* в человеческой клеточной линии аденокарциномы OVCAR-3 заканчивалось развитием фенотипа МЛУ. Мутация *PTEN* вызывает устойчивость к препаратам платины через *PTEN*-опосредованную активацию PI3K/Акт сигнальный путь, блокаду апоптоза и активацию экспрессии генов ABC [Lee S., et al., 2005].

На уровне опухоли, одним из механизмов активации экспрессии ABC-транспортёров и формирования адаптивной МЛУ является **деметилирование промоторных областей** генов ABC. Присоединение метильной группы к цитозину в промоторной области гена препятствует его экспрессии, а снижение метилирования промотора (гипометилирование или деметилирование), наоборот, увеличивает активность гена. Гены ABC-транспортёров в опухолях различных локализаций зачастую имеют гипометилированные промоторы и могут активно экспрессироваться [Chekhun V.F., et al., 2006, Sharma G., et al., 2010]. Деметилирование промоторов продемонстрировано для лейкозной линии HL-60 после воздействия лекарственных средств [Desiderato L., et al., 1997], для линии человеческого Т-лимфоцитарного лейкоза [Kantharidis P., et al., 1997] острого миелолейкоза, рака мочевого пузыря [El-Osta A., et al., 2002]. На клеточных культурах опухоли молочной железы и колоректальных опухолях было показано, что гены ABC с деметилированными промоторами активно экспрессируются. В частности, *ABCB1* был гиперметилирован в 28% колоректальных опухолей, и это сочеталось с чувствительностью к химиотерапии [Chekhun V.F., et al., 2006, El-Osta A., et al., 2001, El-Osta A., et al., 2002, Shannon B.A., et al., 2001].

Кроме этого, было обнаружено, что клетки лейкемии, не экспрессирующие *ABCB1*, имеют метилированный промотор данного гена (El-Osta A, et al., 2002; El-Osta A and Wolffe AP. 2001). В исследовании [Chekhun V.F., et al., 2006] было показано гипометилирование области промотора генов *ABCB1* и *GSTP1* в MCF-7/R – линии клеток, резистентных к доксорубину. Р-гликопротеин гиперэкспрессировался в клетках с фенотипом МЛУ KB/VJ300 и KB-C1, при этом промотор *ABCB1* гипометилирован [Kusaba H., et al., 1999]. Кроме того, есть много данных, демонстрирующих, что химиопрепараты уменьшают метилирование ДНК и ингибируют активность диацетилирования гистонов [Hanafy S., et al., 2011, Samlowski W.E., et al., 2005, Wilting R.H., et al., 2012], которые могут сделать промоторы генов ABC доступными для активации транскрипции. Интересные данные были получены группой турецкий исследователей, которые показали, что уровень метилирования гена *ABCB1* был выше в опухолях молочной железы с экспрессией рецепторов к эстрогенам и ниже в опухолевых клетках с наличием мутаций в гене *TP53* [Atalay C., 2008].

Было показано, что ацетилтрансфераза гистонов (НАТ) и диацетилаза гистонов (HDAC) регулируют экспрессию гена *ABCB1* в SW620 (человеческого рака ободочной кишки), когда клетки обрабатывались ингибитором HDAC trichostatin [Jin S., et al., 1998, Scotto K.W., 2003]. Важность ацетила-Н3 в регулировании экспрессии ABC-транспортеров была также подтверждена независимым исследованием, в котором было показано стимуляция экспрессии генов ABC в клетках SW620 после 24-часовой обработки химиопрепаратами была связана с резко увеличенной концентрацией ацетила-Н3, но не ацетила-Н4, в промоторах генов ABC-транспортеров [Baker E.K., et al., 2005]. Репрессивный маркерный ген гистона trimethylated H3-Lys9, был связан с экспрессией другого множественного лекарственного транспортера *ABCG2* [Robey R.W., et al., 2007, To K.K., et al., 2008]. Эти исследования указывают, что статус ацетилирования Н3 играет важную роль в регулировании экспрессии ABC-транспортеров.

Геномная нестабильность может активировать экспрессию ABC-транспортеров. На клеточной линии человеческой саркомы матки MES-SA было показано, что непосредственные мутации гена *ABCB1* лежат в основе адаптивной МЛУ этих клеток, которые приобрели устойчивость к доксорубину, паклитакселу и винбластину [Chen K.G., et al., 2005]. Генные перестановки, которые приводят к образованию гибридных транскриптов *ABCB1* представляют общий механизм для адаптивной активации *ABCB1*/Р-гликопротеина. Перестановки могут образовываться хаотично и в них вовлекаются несколько генов, локализованных хромосоме 7 и других хромосомах, в которых локализованы гены ABC. Такие хромосомные перестройки могут возникать в процессе

химиотерапии при повреждении ДНК химиопрепаратами усиливается негомологичная рекомбинации, которая и приводит к перестройкам [Huff L.M., et al., 2006]. Амплификации локусов генов ABC-транспортёров в контексте химиорезистентности обсуждается более широко. Показано, что амплификация локусов генов ABC обуславливают формирование резистентных опухолевых линий и повышенный уровень экспрессии ABC-транспортёров при многократной обработки химиопрепаратами. [Flahaut M., et al., 2006, Katoh H., et al., 2005, Pang E., et al., 2005, Van Dekken H., et al., 2008]. Как влияют на экспрессию генов ABC-транспортёров хромосомные аномалии других локусов и генома в целом известно мало. Это представляется важным аспектом для исследования клинической опухоли, которая характеризуется большим спектром хромосомных аномалий.

Внутриопухолевая гетерогенность в настоящее время считается одним из основных препятствий на пути успешного лечения опухолей. При этом переменными в пределах опухоли оказываются многие важные характеристики и экспрессия мишеней химиопрепаратов. Показана переменная экспрессия генов *TOP2a*, *c-myc*, *CyclinD1*, микроРНК, HER2, рецепторов к эстрогенам и прогестерону в пределах опухоли [Glockner S., et al., 2002, Nassar A., et al., 2010, Potts S.J., et al., 2012, Raychaudhuri M., et al., 2012, Seol H., et al., 2012, Вторушин С.В. и др., 2011]. Установлена значительная внутриопухолевая генетическая гетерогенность метапластического и трижды-негативного РМЖ, наиболее агрессивных и прогностически неблагоприятных форм данного заболевания [Geyer F.C., et al., 2010, Ng C.K., et al., 2012, Patani N., et al., 2011].

Интересны новые подходы исследованию внутриопухолевой гетерогенности, разрабатываемые в Томском НИИ онкологии. Инвазивный протоковый рак составляет основную долю РМЖ (до 75% всех случаев) и характеризуется переменностью клинического течения, что вероятно, является результатом значительного внутриопухолевого морфологического разнообразия. В Томском НИИ онкологии охарактеризована внутриопухолевая морфологическая гетерогенность данной формы РМЖ, представленная наличием 5 различных типов инфильтративного компонента, или морфологических структур, включающих тубулярные, солидные, трабекулярные, альвеолярные структуры и дискретные группы опухолевых клеток, и исследованы закономерности ее формирования [Zavyalova M.V., et al., 2013, Завьялова М.В., и др., 2006]. Интересны новые данные о связи чувствительности опухоли к НАХТ с морфологическим строением первичного опухолевого узла при уницентрическом инвазивном протоковом РМЖ. Судя по результатам оценки непосредственного эффекта терапии, преобладание паренхиматозного компонента в опухоли, наличие альвеолярных и

трабекулярных структур в инфильтративном компоненте и выраженная воспалительная инфильтрация стромы могут указывать на низкую чувствительность к НАХТ. Имеется перспектива выявления новых морфологических признаков терапевтического патоморфоза при инфильтрирующем протоковом РМЖ [Завьялова М., и др., 2008]. Получены данные о прогностическом значении альвеолярных структур для лимфогенного метастазирования, а соотношения трабекулярных и тубулярных структур – для гематогенного [Перельмутер В.М., и др., 2007, Perel'muter V.M., et al., 2008, Zavyalova M.V., et al., 2011]. Найдена связь внутриопухолевой морфологической гетерогенности с молекулярными подтипами. Оказалось, что трижды-негативные опухоли чаще характеризуются наличием одного (любого) типа морфологических структур, тогда как при люминальном РМЖ в основном встречаются опухоли с пятью типами структур [Zavyalova M.V., et al., 2013]. Представляет интерес изучение влияния внутриопухолевой морфологической гетерогенности на экспрессию АВС-транспортеров.

В литературе имеются противоречивые данные по взаимосвязи экспрессии интегринов с химиорезистентностью опухолевых клетках. Клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7, приобретающие фенотип МЛУ при обработке доксорубицином по сравнению с необработанными клетками, характеризуются резко сниженной экспрессией большинства интегринов $\beta 1$ -подсемейства ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, но не $\alpha 5\beta 1$) [Kozlova N.I., et al., 2004, Morozevich G., et al., 2009, Morozevich G., et al., 2011]. С другой стороны, имеется множество данных о том, что экспрессия интегринов на поверхности опухолевых клеток и их взаимодействие с экстраклеточным матриксом приводит к развитию, так называемой, опосредованной клеточной адгезией лекарственной устойчивости (CAM-DR). Она выражается в снижении уровня апоптоза, увеличении выживаемости и инвазии опухолевых клеток. Экспрессия в опухоли молочной железы интегринов $\alpha 6\beta 4$ и $\alpha \nu\beta 3$ приводит к увеличению размера опухоли, степени злокачественности, снижению выживаемости пациентов и повышению частоты гематогенного метастазирования [Desgrosellier J.S., et al., 2010]. Недавно было показано, что коллаген/ $\beta 1$ интегрин/ERK сигнальный путь up-регулирует экспрессию гена *ABCC1* в клетках лимфомы Jurkat, экспрессия интегрин и его взаимодействие с матриксом стимулирует экспрессию генов химиорезистентности [El Azreq M.A., et al., 2012].

По экспрессии Е-кадгерина альвеолярные структуры не отличаются от остальных типов. Е-кадгерин down-регулирует экспрессию генов АВС, в то время как при эпителиально-мезенхимальном переходе (EMT) экспрессия Е-кадгерина на поверхности клеток существенно снижается. Индукция EMT up-регулирует экспрессию нескольких АВС-транспортеров. Это происходит за счет того, что промоторы АВС-транспортеров

несут несколько связывающих участков для факторов транскрипции Twist, Snail, и FOXC2, которые стимулируют EMT и их высокая экспрессия увеличивает промоторную активность ABC-транспортеров [Saxena M., et al., 2011]. В свою очередь экспрессия Snail и EMT в опухолевых клетках может индуцироваться химиопрепаратами, в частности доксорубицином [Li1, et al., 2011].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ К ЛИТЕРАТУРНОМУ ОБЗОРУ

В настоящее время не существует общепринятых предсказательных факторов эффективности НАХТ, которые позволили бы с одной стороны, значительно оптимизировать использование НАХТ и избавить пациентов с резистентными и малочувствительными опухолями от токсичного и дорогостоящего лечения, с другой стороны позволили бы планировать адьювантную химиотерапию. Традиционно определение тактики лечения онкологических больных производится на основании клинических и морфологических характеристик опухолевого процесса. Несмотря на то, что распространенность опухолевого процесса является наиважнейшим критерием прогноза и выбора тактики лечения, далеко не всегда наблюдается ее корреляция с эффективностью лечения и вариантом исхода болезни. Подразделение больных на группы на основании экспрессионных характеристик опухоли (молекулярные подтипы) с целью определения дальнейшей тактики ведения таких пациенток не позволяет индивидуализировать назначение НАХТ. Лечение трижды-негативного рака, его прогноз, остается непонятным и очень вариабельным. Назначение схем лечения НАХТ и адьювантной химиотерапии при лимфогенном метастазировании для люминального А и В рака также не определено и, по сути, предсказать эффективность НАХТ в зависимости от молекулярных субтипов РМЖ не удастся.

Таким образом, использование известных прогностических и предсказательных критериев не позволяет сделать эффективный выбор химиопрепаратов и тактики лечения конкретного больного. Они не всегда позволяют с высокой степенью вероятности оценить риск прогрессирования заболевания у отдельного больного и, следовательно, определить план индивидуальной адекватной тактики лечения. Это делает актуальным разработку новых прогностических и предсказательных критериев для персонификации терапии, которые будут отражать механизмы чувствительности и резистентности опухоли к химиотерапии и учитывать индивидуальные особенности организма больного и опухоли в соответствии с принципами молекулярной онкологии. Такой подход является в настоящее

время основным мировым трендом развития лекарственного лечения злокачественных новообразований.

Основной причиной неэффективности химиотерапии опухоли считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), который характеризуется способностью опухолевых клеток выживать в условиях высоких доз широкого спектра химиопрепаратов. Выделяют два типа МЛУ: предрасполагающую МЛУ и приобретенную или адаптивную МЛУ, которая возникает в процессе химиотерапии. Считается, что мажорным механизмом фенотипа множественной лекарственной устойчивости является функционирование продуктов генов семейства ABC-транспортеров (ATP-Binding Cassette), которые в опухолевых клетках ABC-транспортеры осуществляют выброс цитостатических препаратов, таргетных (лапатиниб, иресса, софатиниб, герцептин, акситиниб и др.) и гормональных средств из опухолевых клеток против градиента концентрации с затратой энергии АТФ.

В экспериментальных исследованиях достаточно четко доказана роль ABC-транспортеров в формировании фенотипа предрасполагающей и адаптивной МЛУ и их определяющую роль в устойчивости опухоли к действию химиопрепаратов. Клинические данные по этому вопросу, в достаточной степени, гетерогенны. Множество литературных источников свидетельствуют о том, что в клинических условиях для рака молочной железы предрасполагающая МЛУ, обусловленная исходным уровнем экспрессии ABC-транспортеров, не играет существенной роли в механизмах устойчивости опухоли молочной железы к химиотерапии. Высокий уровень экспрессии генов ABC и их продуктов в опухолевых клетках не обеспечивает устойчивость к химиопрепаратам и не является неблагоприятным прогностическим фактором. Немногочисленные клинические исследования адаптивной МЛУ, в определенной мере подтверждают только отсутствие эффекта лечения при стимуляции экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в процессе химиотерапии, и даже эти исследования во многом противоречивы и ограничены очень узким кругом ABC-транспортеров. При этом совершенно не изучено, с чем связан ответ опухоли молочной железы на химиотерапию, почему, при лечении по одной и той же схеме у одних пациентов наблюдается ответ на химиотерапию, а у других лечение не эффективно, и как во всем этом участвуют ABC-транспортеры.

Исследования механизмов регуляции генов ABC-транспортеров как раз и важны с точки зрения понимания процессов формирования фенотипа множественной лекарственной устойчивости в клинических условиях. Хорошо известно, что разнообразные генетические и эпигенетические регулирующие механизмы составляют плотно скоординированную сеть, которая активизирует транскрипцию ABC-транспортеров.

Практически все гены ABC являются индуцибельными генами, и их транскрипционная активность возрастает в ответ на самые разные стрессорные воздействия, включающие, влияние химиотерапевтических препаратов, химических канцерогенов, гипоксию, некоторые цитокины (ФНО α , ИЛ6), белки теплового шока, агенты, индуцирующие дифференцировку и многое другое. Изменение (повышение или снижение) экспрессии генов ABC в ответ на воздействие химиопрепаратов – является отражением индивидуального паттерна регуляции генов ABC свойственный конкретному пациенту и его опухоли и именно оно является отражением взаимодействия индивидуальных регуляции и химиотерапевтических средств на опухоль.

Изучение экспрессии ABC-транспортеров в процессе химиотерапии и механизмов их регуляции, поможет понять причины и факторы, которые определяют индивидуальную вариабельность ответа на химиотерапию, причины химиочувствительности и химиорезистентности, позволит разрабатывать методы прогнозирования ожидаемой эффективности химиотерапии и наметить новые стратегии регулирования фенотипа МЛУ в опухоли молочной железы. Именно этому и посвящена представляемая диссертационная работа.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 МАТЕРИАЛЫ

2.1.1 Пациенты и лечение

Было обследовано 145 больных РМЖ с морфологически верифицированным диагнозом и клинической стадией ПА – ШС (T₁₋₄N₀₋₃M₀), в возрасте 28–68 лет (средний возраст 47,43 ± 0,78 лет), получавшие в 2006-2010 годах лечение в клиниках ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск, Россия). Исследование проходило в соответствии с Хельсинкской Декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.) и с разрешения локального этического комитета института, все пациенты подписали информированное согласие на исследование. Больные имели ПА – ШС стадии и в соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26 – 28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [Schwartz G.F., et al., 2004] в неoadъювантном режиме получали 2-4 курса химиотерапии по схемам FAC (5-fluorouracil 600 мг/м², adriamycin 50 мг/м² и cyclophosphamide 600 мг/м² один раз в 3 недели), CAХ (cyclophosphamide 100 мг/м² внутримышечно, adriamycin 30 мг/м² внутривенно, xeloda 1200 мг/м² перорально), или монотерапия таксотером (100 мг/м² часовая инфузия в день). Через 3-5 недель после НАХТ проводилась операция в объеме радикальной или подкожной мастэктомии, радикальной резекции, секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией или другого вида органосохранной операции, затем больным проводили 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ и Международного противоракового союза (International Union Against Cancer) [Hayward J., et al., 1977] с помощью УЗИ и/или маммографии, которые проводили до лечения, после 2 курсов НАХТ и перед операцией. Регистрировали полную регрессию (100% уменьшение опухоли), частичную регрессию (уменьшение объема опухоли более чем на 50%), стабилизацию (снижение объема менее чем на 50% или увеличение не более, чем на 25%) и прогрессирование (увеличение объема опухоли более чем на 25%). Согласно международным рекомендациям, при проведении предоперационной химиотерапии больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составляют группу с отсутствием ответа на НАХТ, а больные с частичной регрессией – группу с объективным ответом [Kaufmann M., et al., 2012]. Основную исследовательскую группу составили 120 больных. У них была изучена экспрессия генов ABC-транспортеров в биопсийном материале до лечения и генов и белков ABC-транспортеров в операционном

материале после НАХТ. Основные клинико-патологические данные этих пациентов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Клинико-патологические параметры больных РМЖ

Клинико-патологический параметр		N (%)
Возраст (лет)	≤45	45 (37,5)
	>45	75 (62,5)
Менструальный статус	Пременопауза	84 (70,0)
	Постменопауза	48 (30,0)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	102 (85,0)
	Инвазивный дольковый рак	7 (5,8)
	Медулярный рак	5 (4,2)
	Другие типы	6 (5,0)
Размер первичной опухоли	T ₁	17 (14,2)
	T ₂	89 (74,2)
	T ₃	8 (6,6)
	T ₄	6 (5,0)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	46 (38,3)
	N ₁	51 (42,5)
	N ₂	14 (11,7)
	N ₃	9 (7,5)
Статус рецепторов эстрогенов	Положительный	61 (50,8)
	Отрицательный	52 (43,4)
	Нет данных	7 (5,8)
Статус рецепторов прогестерона	Положительный	60 (50,0)
	Отрицательный	53 (44,2)
	Нет данных	7 (5,8)
HER2	0/+	83 (69,2)
	++	17 (14,2)
	+++	12 (10,0)
	Нет данных	8 (6,6)
Гистологическая форма	Уницентрическая	85 (70,8)
	Мультицентрическая	35 (29,2)
Схема НАХТ	САХ	37 (30,8)
	ФАС	58 (48,4)
	Тасотер	25 (20,8)
Ответ на НАХТ	Полная регрессия	14 (11,7)
	Частичная регрессия	58 (48,3)
	Стабилизация	39 (32,5)
	Прогрессирование	9 (7,5)

Примечание: НАХТ – неoadьювантная химиотерапия; САХ – Cyclophosphamide-Adriamycin-Xeloda; ФАС – 5-Fluorouracil-Adriamycin-Cyclophosphamide; HER2 – тестирование выполнено в соответствии с рекомендациями Американского Общества Клинической Онкологии/Колледжа Американских Патологов [Wolff A.C., et al., 2007, Wolff A.C., et al., 2007].

25 больных РМЖ составили независимую группу для изучения динамики изменения экспрессии генов МЛУ при НАХТ. У них экспрессия генов ABC-транспортеров изучалась

в биопсийных образцах опухоли: до лечения, на 7 сутки от начала химиотерапии, на 21 сутки от начала лечения и в операционном материале после НАХТ. Результаты исследования экспрессии генов ABC-транспортеров в опухолевой ткани этих больных были использованы для проверки установленных на основной группе закономерностей. По своим клинко-морфологическим показателям независимая группа не отличалась от основной группы.

После операции удаленная опухоль и регионарными лимфатическими узлами подвергалась патоморфологическому исследованию. Для этого брали фрагменты из центра опухоли, с периферии и на границе опухоли с окружающей тканью. Фрагменты фиксировали в 10% нейтральном формалине, с последующей заливкой в парафин. Готовые гистологические препараты окрашивались гематоксилин-эозином по Ван-Гизону.

Наблюдение за больными после окончания лечения и выписки из стационара проводилось регулярно путем контрольного обследования на первом году через три месяца, в дальнейшем – один раз в шесть месяцев. При контрольном обследовании выполнялись: общеклиническое обследование с проведением ЭКГ, рентгенография органов грудной клетки, спиральная компьютерная томография с внутривенным контрастированием (по показаниям), ультразвуковое исследование органов брюшной полости, сцинтиграфия.

2.1.2 База данных больных РМЖ

Для выполнения исследований была создана электронная база данных для регистрации пациентов со злокачественными новообразованиями молочной железы, обратившихся в клинику НИИ онкологии СО РАМН, и внесение сведений о пациентах. На электронную базу данных получено регистрационное Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013621213 от 24 сентября 2013 г. «База данных экспрессионных и клинко-патологических параметров пациентов с диагнозом рак молочной железы»

База данных выполнена на основе СУБД «Microsoft Office Excel 2007» и имеет характер деперсонифицированной сводной таблицы. Однотипные данные сгруппированы в отдельных столбцах, при этом в первом столбце указан шифр (Пин код), кодирующий фамилию, имя и отчество пациентов, по которым ведется учет.

Разработанная база данных предназначена для регистрации больных раком молочной железы, получающих лечение в НИИ онкологии СО РАМН, систематизации персональных клинко-патологических данных и данных об уровне экспрессии генов

множественной лекарственной устойчивости и генов химиочувствительности. База является основой при проведении исследований с целью оптимизации стратегии химиотерапии рака молочной железы на основе факторов химиорезистентности и химиочувствительности. В базе ведется учет состояния больного при первичном обращении и после проведенного химиотерапевтического, операционного, лучевого и/или гормонального лечения, а также представлены подробные гистоморфологические характеристики опухоли для последующего сопоставления с экспрессионными профилями опухолевой ткани пациентов в процессе химиотерапии. База данных структурирована по следующим разделам: шифр пациента; наличие информированного согласия; данные амбулаторной карты; анамнестические данные; характеристика опухоли; сведения о лечении пациентов; исход лечения; информация об уровне экспрессии генов; информация о биологическом материале. Электронная база данных позволяет проводить многоаспектный поиск по любому полю или совокупности полей входного формата, систематизировать отобранный массив, а также проводить просмотр и распечатку сведений по заданным условиям с расположением полей в удобной последовательности. База рабочая, постоянно пополняется, не требует особого обучения персонала. Фрагмент базы данных представлен на рисунок 3.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	ПИН-код	Наличие инф. согласия	Дата подписания	Номер амб. карты	Диагноз	Возраст, лет	Возраст менархе, лет	Менструальны
2	A1	Да	26.04.2008	138173	РМЖ	57	11	Постменопауза (С
3	A2	Да	11.11.2006	133521	РМЖ	47	14	Сохран
4	A3	Да	30.08.2008	138771	РМЖ	50	15	Постменопауза (С
5	A4	Да	16.06.2007	135044	РМЖ	51	13	Перменопауза
6	B1	Да	22.05.2008	138288	РМЖ	39	13	Сохран
7	B2	Да	05.08.2008	138654	РМЖ	50	12	Сохран
8	B3	Да	24.04.2007	134784	РМЖ	51	13	Сохран
9	B4	Да	28.02.2010	138042	РМЖ	47	13	Сохран
10	B5	Да	30.01.2010	137127	РМЖ	57	16	Постменопауза (С
11	B6	Да	24.10.2007	137591	РМЖ	68	14	Сохран
12	B7	Да	21.01.2008	139137	РМЖ	47	14	Постменопауза (С
13	B8	Да	06.11.2008	140079	РМЖ	28	13	Сохран
14	B9	Да	05.05.2009	134038	РМЖ	48	12	Постменопауза (С
15	B10	Да	30.01.2007	134179	РМЖ	39	14	Перменопауза
16	B11	Да	21.02.2007	140081	РМЖ	29	12	Сохран
17	B1	Да	04.04.2007	134641	РМЖ	60	11	Перменопауза

Рисунок 3. – Фрагмент «Базы данных экспрессионных и клиничко-патологических параметров пациентов ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН с диагнозом рак молочной железы»

В приведенной базе данных пациентов возможна работа со следующей информацией:

1) пин-код пациента; 2) наличие информированного согласия; 3) данные амбулаторной карты – ее номер, диагноз на момент оперативного вмешательства; 4) анамнестические данные пациента – возраст, возраст менархе, состояние менструальной функции, наследственная отягощенность, количество родов, количество аборт; 5) характеристика опухоли – стадия заболевания по классификации TNM, гистологический тип опухоли, количество лимфоузлов, количество лимфоузлов с метастазами, гистологическая форма опухоли, степень злокачественности, фоновая патология, статус рецепторов эстрогенов,

прогестерона и HER2/неу, молекулярный подтип опухоли; б) сведения о лечении пациентов – схема предоперационной химиотерапии, количество курсов, эффект предоперационной химиотерапии, степень лекарственного патоморфоза, вид операции, адъювантная химиотерапия (схема, количество курсов), адъювантная лучевая терапия (наличие, суммарная очаговая доза), адъювантная гормонотерапия (наличие, препарат); 7) исход лечения – дата, локализация и наличие отдаленного метастазирования, наличие и дата рецидивирования, жизненный статус, безрецидивная, общая и безметастатическая выживаемость; 8) информация об уровне экспрессии генов в биопсийном и операционном материале каждого больного. Список генов включает гены множественной лекарственной устойчивости и гены монорезистентности: *MVP, GSTP1, ABCG1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, ABCB1, ABCB3, ABCC5, BRCA1, RRM1, ERCC1, TOP1, TOP2a, TUBB3, TYMS*; 9) информация о биологическом материале – наличие образцов (до лечения и после операции), дата взятия операционного материала, наличие РНК из опухолевых образцов, наличие ДНК из опухолевых образцов, наличие ДНК из крови, наличие образцов крови. Электронная база данных позволяет проводить сортировку и поиск одного или нескольких заданных показателей с помощью функции автофильтра (рисунок 4).

	A	E	F	G	H	I	J
1	ПИН-код	Диагноз	Возраст, лет	Возраст менархе, лет	Менструальный статус	Наслед. отягощенность	Наслед. отягощенность
3	A2	РМЖ	47	14	Сохранен	Не отягощена	
6	B1	РМЖ	39	13	Сохранен	Не отягощена	
7	B2	РМЖ	50	12	Сохранен	Отягощена	У матери
8	B3	РМЖ	51	13	Сохранен	Отягощена	У сестры РМЖ
9	B4	РМЖ	47	13	Сохранен	Не отягощена	
11	B6	РМЖ	68	14	Сохранен	Отягощена	По линии отца
13	B8	РМЖ	28	13	Сохранен	Отягощена	У бабушки по линии отца
16	B11	РМЖ	29	12	Сохранен	Не отягощена	
19	B3	РМЖ	51	13	Сохранен	Не отягощена	
22	G1	РМЖ	54	14	Сохранен	Отягощена	мать
23	G2	РМЖ	51	15	Сохранен	Отягощена	По линии отца
24	G3	РМЖ	52	15	Сохранен	Не отягощена	
25	G4	РМЖ	45	13	Сохранен	Отягощена	По линии матери
26	G5	РМЖ	35	15	Сохранен	Не отягощена	
28	D1	РМЖ	46	14	Сохранен	Не отягощена	
30	D3	РМЖ	56	13	Сохранен	Не отягощена	

Рисунок 4. – Пример использования автофильтра для формирования выборки больных раком молочной железы с сохраненным менструальным статусом.

Первичная систематизация для последующего статистического анализа, многоаспектный поиск и настройка полей входного формата под конкретный запрос являются необходимыми условиями эффективной работы исследователей.

2.1.3 Забор опухолевого материала

Для молекулярных исследований были использованы биопсийные опухолевые образцы (~10 мм³), взятые под контролем УЗИ: до лечения (в основной и независимой группах), на 7 и 21 сутки от начала НАХТ (для независимой группы), а также

операционный материал (~60–70 мм³) после НАХТ (для обеих групп). Образцы опухоли помещали в раствор RNAlater (Ambion, USA) и сохраняли при температуре –80°C (после 24-часовой инкубации при +4°C) для дальнейшего выделения РНК и ДНК. Для морфологических исследований забор тканей проводился в течение первого часа после выполнения радикальной мастэктомии или органосохраняющих операций. Взятые образцы помещались в 10% рН-нейтральный формалин. Общая продолжительность фиксации была не более 18-24 часов. Материал проводился по стандартной методике и заливался в парафин.

2.2 МЕТОДЫ

2.2.1 Выделение РНК

Тотальная РНК была выделена из 145 биопсийных образцов до лечения, 50 биопсийных образцов, полученных на 7 и 21 сутки после начала НАХТ. Кроме того, РНК выделяли из 131 операционного образца этих же больных после НАХТ. У 14 больных в процессе НАХТ была достигнута полная морфологическая регрессия, и опухолевые клетки при морфологическом исследовании операционного материала отсутствовали. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany, #74134) в соответствии с инструкцией производителя (<http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=4a299ac7-4a55-4ae0-aaca-f3ae8f66d9c1&lang=en>). На первом этапе происходит денатурация ткани опухоли молочной железы при помощи RLT буфера. В пробирку 1,5 мл на один образец ткани добавляли 600 мкл RLT-буфера, который содержит гуанидинизотиоцианат, способный, помимо быстрого лизиса клеток, инактивировать РНК-азы. Опухолевая ткань в пробирках с RLT измельчалась ножницами и прогревалась в течение часа при температуре 56°C, периодически помешивая на вортексе. После инкубации лизат ткани опухоли молочной железы прогоняли через спин-колонки 1, которые содержат ДНК-азу, разрушающую геномную ДНК выделяемого образца. После центрифугирования спин-колонки удалялись, а к стоку добавляли 400 мкл этанола и перемешивали. Этанол добавляли для того, чтобы обеспечить адекватные условия адсорбции РНК на мембране спин-колонок 2. После добавления этанола образец переносили на спин-колонки 2 (MinElute RNeasy). Эти специализированные колонки содержат кварцевую мембрану, которая специфично связывает РНК в клеточном лизате. После инкубации колонок при комнатной температуре в течение 3 мин они центрифугировались 15 сек при 10 000 об/мин. Сток из пробирки удаляли при помощи вакуумного насоса. Далее следовали процедуры очистки адсорбированной на мембране колонок РНК от различных примесей (белков, солей, низкомолекулярных соединений и т.д.). Для этого колонки последовательно промывали промывочным буфером RW1 и дважды промывочным буфером RPE, которые содержат различные солевые буферные растворы. После отмывок колонки помещали в новую пробирку с ингибитором РНК-аз Ribolock (Fermentas, Lithuania). В колонку добавляли 50 мкл milliQ воды и центрифугировали 1 мин при 10 000 об/мин. Потом добавляли еще 50 мкл воды и снова центрифугировали. Пробирка со 100 мкл раствора РНК подписывалась, измерялись

спектрофотометрические показатели РНК и ставился капиллярный электрофорез. На спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,95-2,05$; $A_{260}/A_{230} = 1,90-2,31$.

Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и набора R6K ScreenTape (Agilent Technologies, USA #5067-5367). RIN составил 5,6 – 7,8. (рисунок 5).

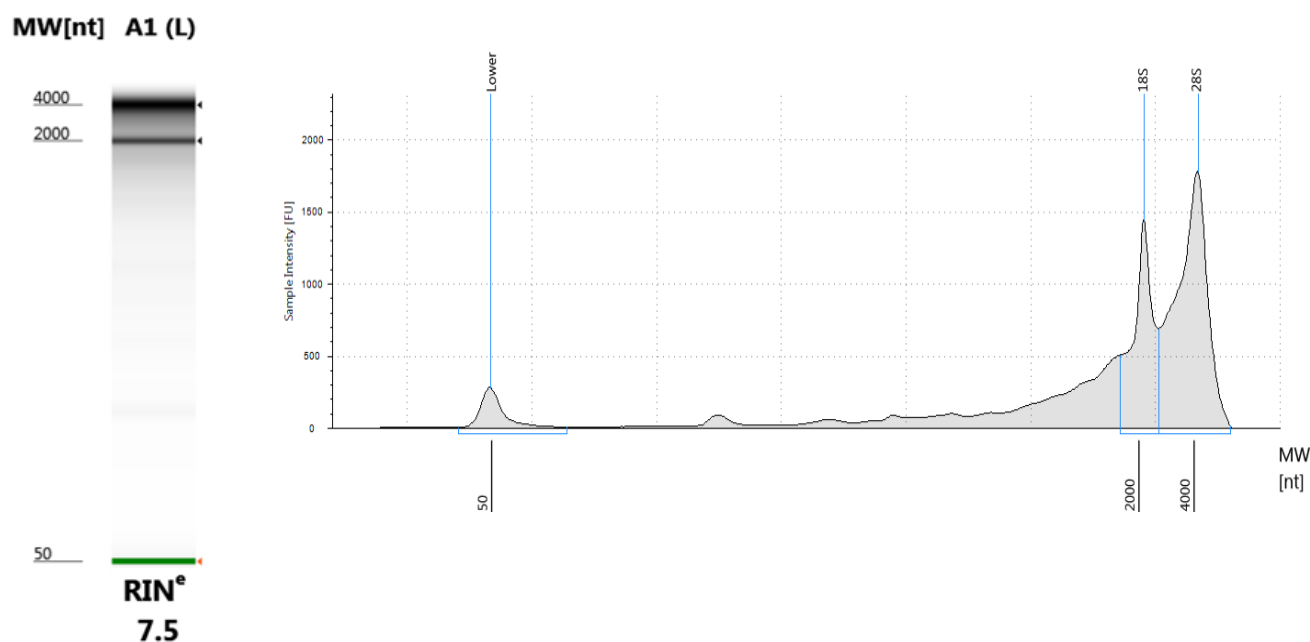


Рисунок 5. – Электрофореграмма и денситограмма тотальной РНК, выделенной из опухоли молочной железы при помощи набора Rneasy Mini Kit Plus (Qiagen, Germany). Капиллярный электрофорез выполнен на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA). Видны бенды 28S и 18S рибосомальной РНК и показатель целостности РНК - RIN (RNA Integrity Number) составил 7.5. Спектрофотометрические показатели этого образца РНК – $A_{260}/A_{280} = 1.95$, $A_{260}/A_{230} = 2.34$, концентрация – 153 нг/мкл

На рисунке 6 представлено фото обычного агарозного электрофореза выделенной РНК и спектрофотометрическая кривая поглощения выделенной РНК. Выделенная РНК хранилась при -80°C в низкотемпературном морозильнике (Sanyo, Japan). Использовалась для оценки экспрессии генов ABC-транспортеров при помощи количественной ПЦР с обратной транскрипцией (RT-qPCR).

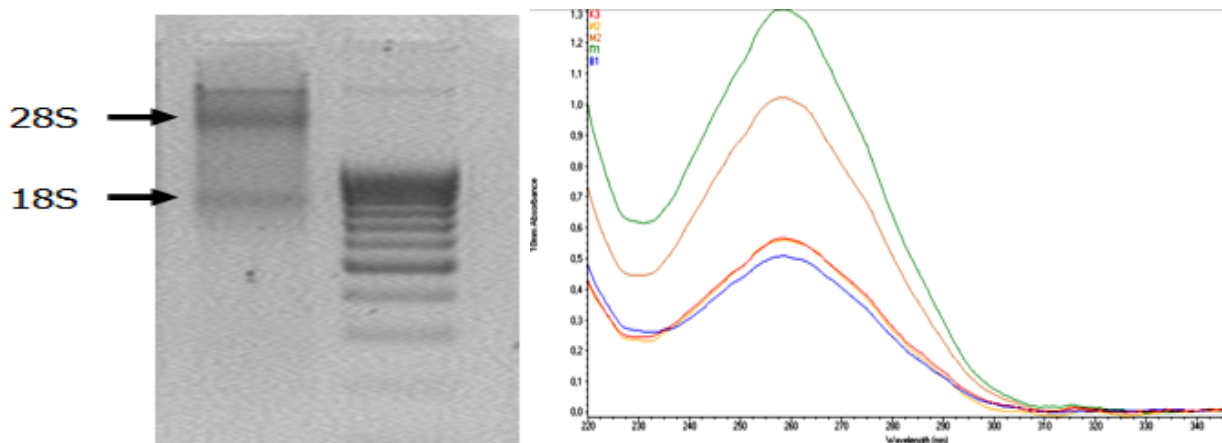


Рисунок 6. – Электрофореграмма РНК, выделенной RNasy Plus mini Kit (Qiagen, Germany) из опухоли молочной железы и спектрофотометрические кривые поглощения нескольких образцов РНК. На электрофореграмме видны бэнды: 28S и 18S рибосомальной РНК. Дорожка справа –маркер молекулярной массы 100bp.

2.2.2 Выделение ДНК

ДНК из опухолевой ткани молочной железы выделяли из 94 образцов (68 биопсий и 26 операционных образцов этих же пациентов) при помощи набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany # 51304) в соответствии с инструкцией производителя (http://www.qiagen.com/knowledge-and-support/resource-center/resource-download.aspx?id=67893a_91-946f-49b5-8033-394fa5d752ea&lang=en). QIAamp DNA mini Kit позволяет существенно упростить выделение ДНК образцов опухолевой ткани молочной железы благодаря спин - колонкам. Не требуется использование хлороформа и фенола. ДНК специфично связывается с силикагельной мембраной QIAamp колонок, в то время как загрязнители проходят через мембрану в сток. Ингибиторы ПЦР, такие как двухвалентные катионы и белки, полностью удаляются, благодаря двухшаговой процедуре отмывки связанной с мембраной ДНК. В результате промывания, остается чистая ДНК, которая элюируется водой.

К образцу опухолевой ткани в пробирке на 1.5 мл добавляли 100 мкл буфера лизис-буфера ALT, содержащего, 0,5% SDS, 8мМ ЭДТА и 20 мкл протеиназы К. Перемешивали и измельчали ножницами и инкубировали в твердотельном термостате («Термит», ДНК-технология Россия) при 56°C в течение 1 часа, интенсивно перемешивая. Добавляли к лизату 200 мкл буфера AL перемешивали на вортексе (FV-2400, Литва) и инкубировали при 70°C 10 мин. В пробирку добавляли 200 мкл всежеперегнанного этанола для создания оптимальных условий для связывания ДНК с силикагельной мембраной QIAamp колонок. Преципитат перемешивали на вортексе и переносили на QIAamp спин-колонок и центрифугировали на высокоскоростной центрифуге («Mini Spin Plus», Eppendorf

Germany) 1 мин на 8000 об/мин. Преципитат удаляли, а в мембрану колонки промывали отмывочными буфером AW1. Добавляли 500 мкл буфера AW1 и центрифугировали при 8000 об/мин 1 мин. Преципитат удаляли и в колонку добавляли 500 мкл промывочного буфера AW2, центрифугировали 14000 об/мин 3 мин и преципитат удаляли. Колонки переносили в новые пробирки и в них добавляли 200 мкл элюирующего буфера AE (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0), культивировали при комнатной температуре 1 мин и затем центрифугировали при 8000 об/мин 1 мин. 200-ми мкл преципитата повторно элюировали ДНК с мембраны. Концентрацию и чистоту выделения ДНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Концентрация составила от 50 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2.10-2.35$; $A_{260}/A_{230} = 2.15-2.40$. Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide (Agilent Technologies, USA # 5067-5365) (рисунок 7). На рисунке 5 хорошо видно, что фрагменты ДНК, в основном, имеют массу более 48 kbp.

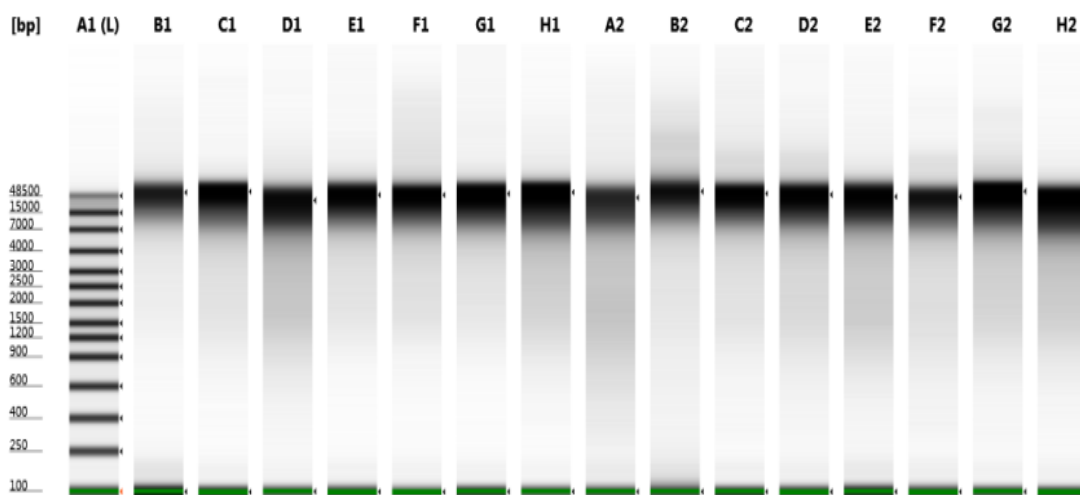


Рисунок 7. – Капиллярный электрофор ДНК, выделенной из биопсийных образцов опухоли молочной железы. Видна хорошая целостность ДНК, масса ДНК более 48 kbp. A1 – маркер молекулярной массы; B1..H2 – образцы ДНК опухолей больных; нижний бенд на каждой дорожке – маркер прохождения электрофореза.

Выделенная ДНК хранилась при -80°C в низкотемпературном морозильнике (Sanyo, Japan) и использовалась для микроматричных исследований, генотипирования полиморфизмов, метилчувствительной ПЦР, бисульфитной модификации с последующим секвенированием.

2.2.3 Горизонтальный и капиллярный электрофорез

Горизонтальный агарозный электрофорез проводили в 1x трис-боратном буфере (ТБЕ), который готовили из 10x ТБЕ (0,89М Трис-НСl, 0,89 М, Борной кислоты и 20mM ЭДТА) разбавляя его водой milliQ. 10 кратный ТБЕ (на 100 мл 10.78 г Трис-НСl, 5,5.г Борной кислоты и 4,38 г ЭДТА). Для приготовления геля в термостойкую коническую колбу наливали 100 мл 1x ТБЕ, к нему добавляли 2,5 г агарозы (Amresco, USA) и 2 капли бромистого этидия, перемешивали и расслаивали в микроволновой печи до прозрачного состояния и однородной консистенции, дав содержимому колбы кратковременно закипеть. После микроволновой печи колбу немного остужали и заливали агарозный гель в заранее приготовленный заливочный столик SE-2 (Helicon, Россия) с гребенкой. После того как гель застывал, гребенку осторожно вынимали и снимали боковые стенки заливочного столика. Заливочный столик без боковых стенок помещали в камеру для горизонтального электрофореза SE-2 (Helicon, Россия). Наливали 1x ТБЕ так, что раствор был на 1-1,5 см выше уровня геля. 10 мкл амплификата смешивали с 2 мкл буфера для нанесения 6xOrange DNA Loading Dye (Fermentas, Lithuania #R0631) и вносили в лунку геля под слой ТБЕ. В первую лунку вносили 3 мкл маркера молекулярной массы 100 bp DNA Ladder (Axygen, USA). Для электрофореза использовали источник PowerPack Basic (Bio-Rad Laboratories). Фотографировали гель на трансиллюминаторе ECX-F15.M (Vilber Lourmat, France). Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) с использованием набора Agilent R6K ScreenTape System Quick Guide. К образцу 1 мкл образца РНК добавляли 4 мкл R6K Sample Buffer, перемешивали и инкубировали при 72°C 3 мин, охлаждали образец 2 мин на льду и помещали в прибор 2200 TapeStation (Agilent Technologies, USA). Для оценки целостности ДНК использовали набор Agilent Genomic DNA ScreenTape System Quick Guide. К 1 мкл опухолевой ДНК добавляли 10 мкл Genomic DNA Sample Buffer, перемешивали на вортексе, центрифугировали для осаждения капель и помещали пробу в прибор для капиллярного электрофореза 2200 TapeStation, дополнительно ставится маркер молекулярной массы.

2.2.4 Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени

Уровень экспрессии генов МЛЮ: *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и *MVP* оценивали при помощи количественной обратно-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе RotorGene-6000 (Corbett Research, Australia). Для получения кДНК на матрице РНК

проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Fermentas, Lithuania) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору.

ПЦР ставили в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2.5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Tris–HCl pH 8,8 при 25°C, 16.6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг кДНК. Двух шаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94°C, 10 мин – предварительная денатурация; 40 цикла – 1 шаг 94°C, 10 сек и 2 шаг 20 сек – при температуре 60°C. Праймеры и зонды (FAM-BHQ1) были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11.5 и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) (таблица 2).

Таблица 2 – Последовательность праймеров и проб исследованных генов

Гены	Ампликон	Последовательность	Дизайн
<i>ABCB1</i> NM_000927.4	93 bp	F 5'-gattgacagctacagcacgg-3'	Оригинальный дизайн
		R 5'-ggtcgggtgggatagttga-3'	
		Probe 5'-tgccgaacacattggaaggaaa-3'	
<i>ABCB3</i> NM_018833.2 NM_000544.3	153 bp	F 5'-ctggtcgtgtgattgacatcct-3'	[Nishimura M., et al., 2002]
		R 5'-gcaagttgattcgagacatggt-3'	
		Probe 5'-aggtgatttgacccccatgccttt-3'	
<i>ABCC1</i> NM_004996.3	87 bp	F 5'-aggtgggctgaggaaaag-3'	Оригинальный дизайн
		R 5'-cggagcccttgatagcca-3'	
		Probe 5'-tggctgagatggacaaagtggag-3'	
<i>ABCC2</i> NM_000392.3	85 bp	F 5'-cctgtcggctctgggaa-3'	Оригинальный дизайн
		R 5'-tgcccttgatggtgatgtg-3'	
		Probe 5'-atgctgggagaaatggaaaatgt-3'	
<i>ABCC5</i> NM_005688.2	76 bp	F 5'-caagagggtaaactggttga-3'	Оригинальный дизайн
		R 5'-ctaaaatggctgaaatgagagag-3'	
		Probe 5'-ggcagtgtgggaagtggaaaa-3'	
<i>ABCG1</i> NM_004915.3	78 bp	F 5'-cctactacctggccaagaccat-3'	[Nishimura M., et al., 2002]
		R 5'-agtacacgatgctgcagtaggc-3'	
		Probe 5'-acgtgcccttcagatcatgttcccagt-3'	
<i>ABCG2</i> NM_004827.2	97 bp	F 5'-aaaggatgtctaagcaggga-3'	Оригинальный дизайн
		R 5'-tgaggccaataaggtgagg-3'	
		Probe 5'-tcgaggctgatgaatggagaag-3'	
<i>GAPDH</i> NM_002046.3	124 bp	F 5'-gccagccgagccacatc-3'	Оригинальный дизайн
		R 5'-ggcaacaatatccactttaccaga-3'	
		Probe 5'-cgccaatacagcaaatccg-3'	
<i>MVP</i> NM_017458.3	87 bp	F 5'-ggaggtgctggaaaaggac-3'	Оригинальный дизайн
		R 5'-tcctcaaatcaagcagcg-3'	
		Probe 5'-ctgccaactgcctccat-3'	

Примечание: все пробы – FAM →BHQ1; NM – номер последовательности РНК в NCBI Nucleotide Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>); bp – base pair; F – прямой праймер; R – обратный праймер.

Синтез праймеров и проб осуществляла фирма ДНК-синтез (Москва, Россия). Проверку чистоты ПЦР-продуктов проводили с использованием электрофореза в 2,5% агарозном геле с 0,2 % бромистым этидием (рисунок 8). В качестве гена-рефери использовали ген «домашнего хозяйства» фермента *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) и уровень экспрессии каждого целевого гена нормализовали по отношению к экспрессии *GAPDH*.

Относительная экспрессия МЛЮ была оценена с помощью метода Pfaffl и следующая формула использовалась для того, чтобы определить отношение экспрессии между образцом и калибратором:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{t,\text{target}}(\text{calibrator} - \text{test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{t,\text{ref}}(\text{calibrator} - \text{test})}}$$

где E – эффективность реакции, Ct пороговый цикл генов мишеней (target) и гена-рефери (ref). $\Delta C_{t,\text{target}}(\text{calibrator} - \text{test}) = C_{t\text{ гена мишени в калибраторе}} - C_{t\text{ гена мишени в опытном образце}}$; $\Delta C_{t,\text{ref}}(\text{calibrator} - \text{test}) = C_{t\text{ гена-рефери в калибраторе}} - C_{t\text{ гена-рефери в опытном образце}}$ [Pfaffl M.W., 2001]. В качестве калибратора использовалась пулированная от 10 пациентов РНК, выделенная из нормальной ткани молочной железы, полученной во время операции от больных, которым не проводилась НАХТ. На рисунке 9 представлены кинетические и стандартная калибровочная кривые для гена рефери *GAPDH*.

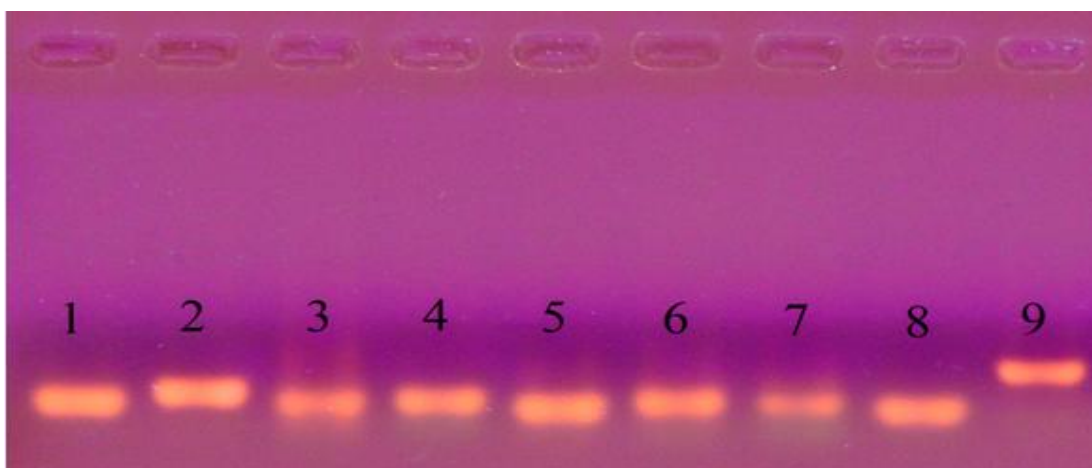


Рисунок 8 – Электрофореграмма ампликонов исследуемых генов ABC

Примечание: 1 – *ABCG2*, 2 – *GAPDH*, 3 – *ABCG1*, 4 – *ABCB1*, 5 – *ABCC1*, 6 – *ABCC2*, 7 – *ABCB1*, 8 – *ABCC5*, 9 – *ABCB3*.

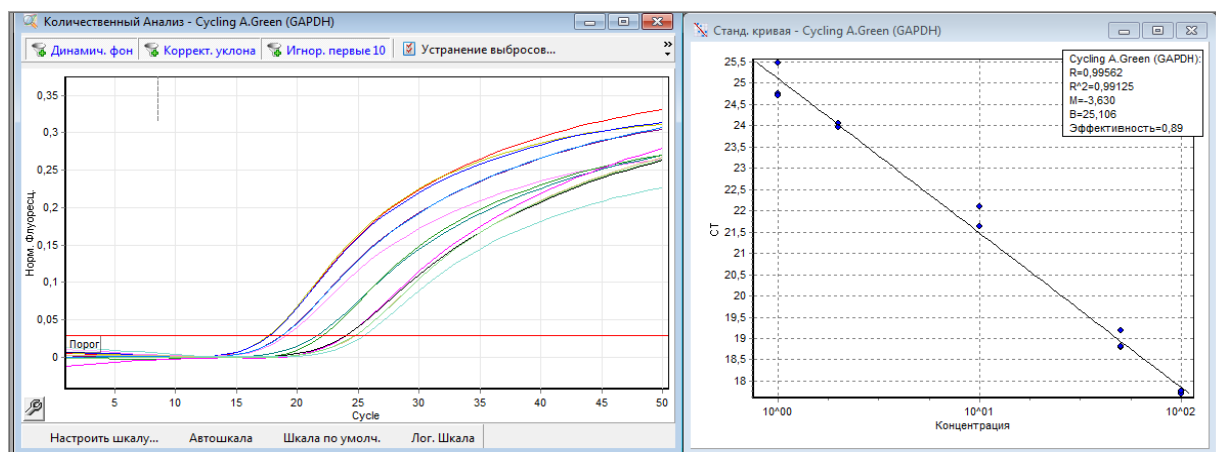


Рисунок 9 – Кинетические кривые амплификации и стандартная кривая для количественной ПЦР гена рефери GAPDH

Таким образом, в качестве результата использовалось различие в экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и *MVP* относительно *GAPDH* и нормальной ткани молочной железы.

2.2.5 Генотипирование по SNP-маркерам

Генотипирование проводили при помощи ПЦР в режиме реального времени. Для проведения ПЦР применяли 96-ти луночные планшеты "Ахуген" (США) PCR-96-FLT-C. ПЦР проводили в режиме реального времени на амплификаторе "CFX96" Bio-Rad Laboratories". Праймеры и зонды были разработаны при помощи программы "Vector NTI 11.5" (Invitrogen, USA) и баз данных <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> и <http://snp500cancer.nci.nih.gov/>. Последовательность праймеров и зондов представлена в таблице 3.

Таблица 3. Праймеры и зонды для генотипирования полиморфизмов.

SNP	Primer/Probe	Sequence	Ta
<i>TP53+119 G>C</i> <i>Arg72Pro</i> <i>rs1042522</i>	F	5'atgaagctcccagaatgc3'	64 °C
	R	5'gccggtgtaggagct3'	
	Probe 1	FAM5'ctgctccccctgggcc3'BHQ1 allele C	
	Probe 2	ROX5'ctgctccccctgggcc3'BHQ2 allele G	
<i>TP53</i> <i>Ex11+2042T>G</i> <i>rs8073498</i>	F	5'tccatccagtcaagcagg3'	61 °C
	R	5'gtttagactgaagccatgagga3'	
	Probe 1	FAM5'tggcagacatgttcctaccctc3'BHQ1 allele T	
	Probe 2	ROX5'tggcagacatgttcctaccctc3'BHQ2 G allele	

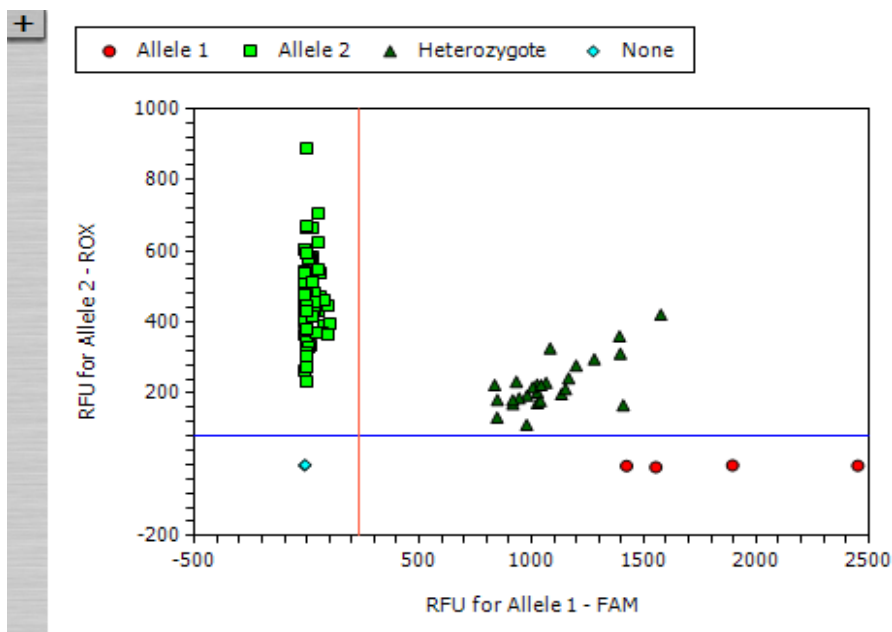


Рисунок 10. – Пример дискриминации генотипов на приборе CFX96 Bio-Rad

Реакционная смесь на 1 пробу (общим объемом 15 мкл) содержала: 1 мкл ДНК, 1,5 мкл буфера для Таq-полимеразы 10-тикратного (160 мМ (NH₄)₂SO₄, 670 мМ Трис-НСl, 15 мМ MgCl₂, 0,1% "Tween-20", 1,5 мкл 25 мМ MgCl₂, 1,5 мкл 2,5 мМ dNTP (Сибэнзим, Россия), 0,2 мкл Таq ДНК-полимеразы (Сибэнзим, Россия), по 0,7 мкл каждого из праймеров с концентрацией 10 пмоль/мкл и по 0,7 мкл каждого зонда с концентрацией 10 пмоль/мкл и вода miliQ до 15 мкл. ПЦР ставили в 96-ти луночных плашках с 2-шаговой программой, состоящей из следующих циклов: 1 цикл – 94°С, 5 минут – предварительная денатурация; 42 цикла – 1 шаг 94°С, 15 секунд и 2 шаг 30 секунд – при температуре отжига праймеров для соответствующего полиморфизма с фотографированием на длине волны красителей FAM и ROX. Определение генотипов проводилось по кинетическим кривым амплификации в автоматическом режиме, с использованием программного обеспечения "CFX96" (рисунок 10).

2.2.6 Метилчувствительная ПЦР

Для детекции метилирования CpG островков промоторных областей ABC-транспортеров использовали метилчувствительную ПЦР [Petrenko A., et al., 2000]. Этот метод основан на способности метил-чувствительных рестриктаз расщеплять (гидролизовать) CpG участки ДНК, не подвергшиеся метилированию и оставлять нерасщепленными 5mCG участки, содержащие метилцитозин. Две алиquotы ДНК, выделенной из биопсийных образцов до лечения подвергали гидролизу: одну часть при помощи смеси метилчувствительных рестриктаз *HpaII* (C↓CGG) и *HpaI* (CGC↓G)

(Сибэнзим, Россия); вторую часть при помощи метилнезависимой рестриктазы *MspI* (C↓CGG) (Fermentas, Thermo Scientific), которая гидролизует участок C↓CGG ДНК независимо от статуса метилирования цитозина. Использование рестриктазы *MspI* необходимо для контроля наличия, доступности сайта рестрикции и полноты прохождения гидролиза матрицы. Все рестриктазы использовали с 5-кратным избытком (на 1 мкг ДНК добавляли 5 ед рестриктазы). ДНК с рестриктазами инкубировали 14 часов, и добавляли еще 2,5 единицы активности рестриктаз. *HpaII* (C↓CGG) и *MspI* (C↓CGG) использовали с буфером SE-B (10 mM Tris-HCl (pH 7.6 при 25°C); 10 mM MgCl₂; 1 mM DTT.), *HpaI* (CGC↓G) с буфером SE-Y (33 mM Tris-ацетат (pH 7.9 при 25°C); 10 mM магний-ацетат; 66 mM калий-ацетат; 1 mM DTT). Полимеразную цепную реакцию ставили с обработанной рестриктазами ДНК в качестве матрицы, с праймерами к промоторам ABC-транспортеров (таблица 4). Эти праймеры содержат сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции, поэтому исследуемый фрагмент амплифицируется только при отсутствии расщепления ДНК по этому сайту. Для внутреннего контроля прохождения ПЦР использовали участок гена *MTHFR* (80 bp) (таблица 4), который не содержит сайтов рестрикции ни одной из рестриктаз. В качестве положительного контроля использовалась геномная ДНК из крови, не подвергавшаяся рестрикции. Праймеры подобраны с использованием программы "Vector NTI 11.5" (Invitrogen, USA). Нуклеотидная последовательность промоторных регионов исследованных генов была найдена в базе данных Transcriptional Regulatory Element Database (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=searchPromForm>).

Таблица 4. – Праймеры для метилчувствительной ПЦР

Гены	Ампликон	Последовательность	Температура отжига
<i>ABCB1</i> > NC_000007.14 Homo sapiens chromosome 7, GRCh38 Primary Assembly	263 bp	F 5'- cagcattcagtc aat ccgggc -3'	61.5°C
		R 5'- ccctacct cgcg ctccttg-3'	
<i>MTHFR</i> внутренний контроль NG_013351.1	80 bp	F 5'- gctgacctgaagcacttgaa -3'	61-65°C
		R 5'- gtgtcagcctcaagaaaaagc -3'	
<i>ABCG2</i> NC_000004.12 Homo sapiens chromosome 4, GRCh38 Primary Assembly	365 bp	F 5'- gctttcag ccggg tgca-3'	64.5°C
		R 5'-cgcc ccgga accttttgagtg-3'	
<i>MVP</i> NC_000016.10 Homo sapiens chromosome 16, GRCh38 Primary Assembly	405 bp	F 5'- agaagcagc ccggg aggataa-3'	64°C
		R 5'- ccggg tgttggtgtaatctgc -3'	

Примечание: полужирным шрифтом с подчеркиванием выделены сайты рестрикции для метилчувствительных рестриктаз и *MspI*

Реакционная смесь на 1 пробу (общим объемом 15 мкл) содержала: 1 мкл ДНК, 1,5 мкл буфера для Таq-полимеразы 10-тикратного (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Трис-НСI, 15 mM MgCl₂, 0,1% "Tween-20", 1,5 мкл 25 mM MgCl₂, 1,5 мкл 2,5 mM dNTP (Сибэнзим,

Россия), 0,2 мкл Taq ДНК-полимеразы (Сибэнзим, Россия), по 0,7 мкл каждого из праймеров с концентрацией 10 пмоль/мкл и по 0,7 мкл каждого зонда с концентрацией 10 пмоль/мкл, 0,2 мкл красителя, импрегнирующего двухцепочечную ДНК – SYBR GreenI и вода *milliQ* до 15 мкл. ПЦР ставили в 96-ти луночных плашках с 3-х-шаговой программой, состоящей из следующих циклов: 1 цикл – 94°С, 5 минут –предварительная денатурация; 42 цикла – 1 шаг 94°С, 15 секунд и 2 шаг 30 секунд – при температуре отжига праймеров для соответствующих праймеров (таблица 4) с фотографированием на длине волны красителей SYBR для контроля прохождения реакции ПЦР.

Температура отжига была подобрана эмпирически. 3 шаг ПЦР элонгация – 30 секунд при температуре 72°С. Визуализацию продуктов ПЦР проводили в агарозной 2.5% геле. Метилированные промоторы давали четкие бэнды определенной массы (таблицы), гипометилированные промоторы не показывали продукты ПЦР, внутренний и положительный контроли выходил, ДНК после обработки *MspI* не давала продукты ПЦР с праймерами к промоторным регионам исследованных генов.

2.2.7 Бисульфитная конверсия

Для подтверждения уровня метилирования промотора *ABCBI*, который был установлен при помощи метилчувствительной ПЦР использовали бисульфитную модификацию с последующим секвенированием. Бисульфитная конверсия проводилась с помощью набора EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, USA) в соответствии с инструкцией к набору. В ходе бисульфитной модификации опухолевой ДНК все С заменялись на Т, кроме тех, что находятся в составе метилированных CpG. После бисульфитной конверсии проводили ПЦР с использованием Hot Start Taq полимеразы (Сибэнзим, Россия) из расчета 1 е.а./реакцию. Использовали праймеры для промотора *ABCBI*, на зоны свободные от CpG островков с полностью конвертированной последовательностью: Sense 5'AGTTTTTGTATTAATTGTAT-3' AntiSense 5'-TTAGGTTTTTTGTGGTAAAGAG-3'. Продукты амплификации визуализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, размер ампликонов составил 360 bp.

2.2.8 Секвенирование

Анализ метилирования CpG повторов в промоторной области гена *ABCBI* осуществляли посредством секвенирования. Ампликоны после ПЦР, с праймерами с полностью конвертированной последовательностью, разгоняли посредством

электрофореза в 2% агарозном геле (FischerBioTech, USA). Бэнд массой 360 bp вырезали из геля и с помощью набора Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Sciences, Великобритания) ДНК очищали от невключившихся праймеров и дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Очищенную ДНК использовали для проведения секвенирующей реакции (BigDye™ Terminator v. 3.1). Полученные продукты анализировали на автоматическом секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, USA).

Файлы секвенирования ДНК обрабатывали с помощью пакета прикладных программ DNADynamo (Blue Tractor Software Ltd., UK). В качестве референсной последовательности использовали варианты гена *ABCBI* (NM_000927), полученные из базы данных Национального института биотехнологии (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.2.9 Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков ABC

На первом этапе проводилась депарафинизация срезов с блоков операционного опухолевого материала после НАХТ по стандартной схеме. Сначала для расправления срезов стекла со срезами помещали в термостат при 56°C на 30 минут, затем на стекла наносили 3 порции ксилола и выдерживали каждую порцию 10 мин при температуре 39°C. Ксилол удаляли и проводили стекла по спиртам 96% 3 порции по 5 мин. После проводки стекла со срезами помещали в дистиллированную воду на 5 мин. На следующем этапе проводили высокотемпературную демаскировку по стандартной программе томления на водяной бане с использованием модуля PT Link (Dako Agilent Technologies, USA) или комплексную обработку под давлением и температурой на модуле Pascal (Pascal Pressurized Heating Chamber, Daco Denmark) по программе 121°C, 20 Па давление, 30 сек. Для каждого антигена использовали свой буфер для демаскировки (цитратный, EDTA-буфер или Трис-буфер, производства SpringBioscience, USA). После процедуры стекла переносили в держатель и промывали фосфатным буфером по две порции в течение 5 мин. На обведенные гидрофобным стеклографом срезы наносим реагент блокирующий эндогенную пероксидазную активность (Peroxidase blocking reagent, “Dako”) и инкубировали 5 минут при комнатной температуре, потом стекла 5 мин промывали дистиллированной водой и 5 минут фосфатным буфером. Наносили первичные/специфичные антитела и инкубировали 30 минут, при температуре 25°C (рабочее разведение антител готовилось в день исследования, концентрация была заранее подобрана эмпирически). Использовали следующие первичные моноклональные антитела: Авсв1 Р-гликопротеин - PGLYM (Novocastra™ Lyophilised antibodies, Leica

Biosystems, UK), Abcc1 - Multidrug Resistance-Associated Protein MRP1 (Novocastra™ Lyophilised antibodies, Leica Biosystems, UK); Abcc2 - Multidrug Resistance-Associated Protein Anti-MRP2 antibody [M2 III-6] (ab3373) (Abcam, UK); Abcg1 - ATP-Binding Cassette Sub-Family G Member 1 Anti-ABCG1 [EP1366Y] antibody (ab52617) (Abcam, UK); Abcg2 - Breast Cancer Resistance Protein Anti-BCRP/ABCG2 antibody [BXP-21] - Hematopoietic/Neural Stem Cell Marker (ab3380) (Abcam, UK); Mvp – Major Vault Protein Anti-MVP antibody [0.N.389] (ab14562) (Abcam, UK). После инкубации с первичными антителами стекла со срезами промывали в фосфатном буфере (2 порции по 5 мин) и наносили визуализирующую систему Dako EnVision на 30 минут при температуре 25°C. После инкубации стекла со срезами промывали от не связавшейся визуализирующей системы фосфатным буфером (2 порции по 5 мин). Наносили раствор ДАБ (диаминобензидина жидкий ДАБ производства фирмы Dako). Готовится перед применением. К 1 мл ДАБ-буфера +1 капля ДАБ-хромогена (наносили на стекла на 5 минут, контролируя появление окраски/ход реакции под микроскопом. Стекла со срезами промывали в водопроводной воде – 10 минут, докрашивали срезы гематоксилином - 40 секунд (30 сек в красителе, 10 сек дать стечь), промывали в водопроводной воде 10 минут, проводили по спиртам (96°) – 3 порции по 5 минут, по толуолу – 3 порции по 5 минут и заключали в канадский бальзам.

С помощью светового микроскопа «Axiostar plus» (Carl Zeiss, Germany) детально оценивалось экспрессия белков ABC-транспортеров в опухолевых клетках и в строме. В качестве результата использовали значение % опухолевых и стромальных клеток, экспрессирующих изучаемый белок. Фотографирование микропрепаратов осуществляли с использованием цифровой камеры AxioCam MRc5 с программой компьютерной обработки изображений AxioVision 4.6.3 (Carl Zeiss, Germany).

2.2.10 Морфологическое исследование

Для окрашивания микропрепаратов применяли растворы красителей гематоксилина и эозина, приготовленные по общепринятым прописям. Морфологическое исследование проводилось с помощью светового микроскопа «Axiostar plus» (Carl Zeiss, Germany). Фотографирование микропрепаратов осуществляли с использованием цифровой камеры AxioCam MRc5 с программой компьютерной обработки изображений AxioVision 4.6.3 (Carl Zeiss, Germany).

Гистологический тип рака устанавливался согласно рекомендациям ВОЗ, Женева, 2003. При морфологическом исследовании операционного материала оценивались центр,

периферия опухоли. В ткани первичной опухоли в препаратах, изготовленных по стандартной методике и окрашенных гематоксилином и эозином, детально оценивалось морфологическое строение инвазивного компонента. В инфильтративном компоненте РМЖ оценивались тубулярные, трабекулярные, альвеолярные, солидные структуры, дискретные группы клеток, указывалось общее количество разных типов структур в каждом случае. Тубулярные структуры представлены опухолевыми клетками, расположенными в один или два ряда и формирующими подобие трубок. Трабекулярные структуры формируются 2-3 рядами клеток, располагающихся в стромах. Солидные структуры представляют собой поля из сотен клеток разной величины и формы. Альвеолярные структуры имеют небольшой размер (5-25 клеток разнообразной формы, от маленьких с умеренной цитоплазмой и округленным ядром до больших полигональных с гиперхромным ядром) и округлую форму. Клетки, составляющие альвеолярные структуры, изменяются нерегулярной формы и умеренной цитоплазмой. Дискретные группы опухолевых клеток представлены как отдельными клетками, так и группами из 2-5 не соединенных клеток. Все варианты морфологических типов структур представлены в работе [Zavyalova M., et al., 2011].

2.2.11 Микроматричный анализ

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности High-Density SNP-array фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, (<http://www.affymetrix.com/esearch/search.jsp?pd=prod520004&N=4294967292>).

Микроматрица CytoScan™ HD Array представляет собой твердый носитель небольшого размера (например, стекло или кремний) с прикрепленными к нему в определенном порядке короткими олигонуклеотидами (8-80нп) или фрагментами ДНК (размером более 100нп). Прикрепление одного из компонентов реакции к подложке позволяет проводить множество реакций одновременно пространственно разделив детекцию отдельных фрагментов ДНК (консервативных участков генома или однонуклеотидных полиморфизмов - SNPs). CytoScan™ HD Array содержит 2 млн 670 тыс. маркеров – 1 млн 900 тыс. непалиморфных маркеров и более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), позволяющих определить структурные вариации более чем 36 тысяч генов. Наличие полиморфных маркеров на микроматрице позволяет, также определить участки с потерей гетерозиготности (LOH). Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе

Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA). Схематично процедура микроматричного анализа выглядит следующим образом (рисунок 11).

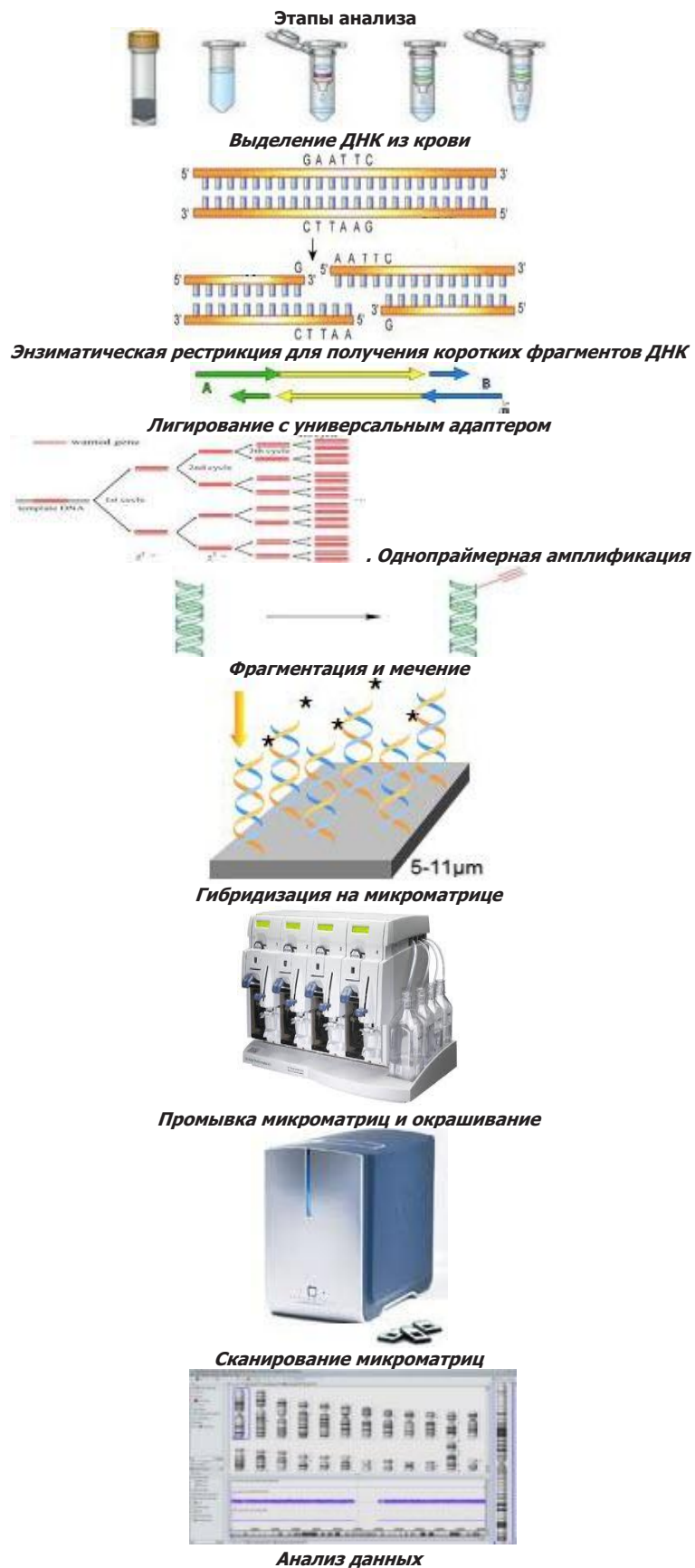


Рисунок 11. – Схематичная последовательность микроматричного анализа проб

Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 2.0» (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов чипирования на матрице CytoScan™ HD Array. При помощи программы в хромосомах определяли несбалансированные хромосомные aberrации – делеции и амплификации (Loss и Gain), представляющие собой CNA – Copy Number Aberration (aberrации числа копий). Поскольку в образцах опухолевой ткани обязательно присутствуют стромальные элементы и другие нормальные клетки, в полученной ДНК высок процент нормальной геномной ДНК. Микрочип CytoScan™ HD Array позволяет выявлять 5% и более мутантной ДНК. Практически во всех случаях CNA были мозаичными, т.е. мутантная опухолевая ДНК определялась на фоне нормальной ДНК. Процент мутантной ДНК – статус числа копий (CN-state), колебался от 15 до 88%. В программе «Chromosome Analysis Suite 2.0» мозаицизм графически представляется аллельными пиками (Allele Peaks) с 4-мя «полосками» (AAA, AAB, ABB, BBB). Показатель snpQC колебался от 9 до 25 и отрицательно коррелировал с частотой CNA. Даже при низких значениях snpQC ширина Allele Peaks была «хорошей» (по классификации базы progenetix [Cai H., et al., 2012]) для идентификации CNA.

2.2.12 Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., США). Для каждой выборки вычисляли среднее арифметическое и среднюю квадратичную ошибку, определяли коэффициент корреляции Спирмена. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, непараметрический критерий Вилкоксона для связанных групп. В отдельных случаях использовали логистическую регрессию для определения связи изучаемых параметров. Распределение генотипов в исследуемой популяционной выборке больных РМЖ проверено на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. Различия между исследуемыми группами считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Для анализа безметастатической выживаемости использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера [Kaplan E.L., et al., 1958]. Сравнение достоверности различий между группами производилось с помощью log-rank теста. Сравнение частот по качественным данным анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера. Отношение шансов – OR, относительный риск – RR и уровень значимости p по двухстороннему критерию Фишера вычисляли при помощи калькулятора <http://vassarstats.net/odds2x2.html>.

ГЛАВА 3 ЗНАЧИМОСТЬ ЭКСПРЕССИИ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ ОТВЕТА НА ЛЕЧЕНИЕ

3.1. Экспрессия АВС-транспортёров в опухоли молочной железы в зависимости от основных клинико-морфологических параметров

Как обычно, в любых клинических ассоциативных исследованиях, на первом этапе надо провести анализ связи изучаемого признака с основными клинико-морфологическими параметрами злокачественного процесса. Это важно с точки зрения выявления дальнейших направлений исследований и с точки зрения исключения или учета в дальнейшем анализе тех или иных клинических показателей, в случае, если выявлено их влияние на изучаемый признак. В настоящем разделе была изучена связь уровня экспрессии генов МЛУ до лечения и после проведения НАХТ с основными клинико-морфологическими параметрами. В таблице 5 представлены данные по связи уровня экспрессии АВС-транспортёров с возрастом и менструальным статусом пациенток. Установлено, что уровень экспрессии гена *ABCB3* (*TAP2*) в биопсии до лечения у молодых пациентов выше, чем у больных в возрасте более 45 лет с высоким уровнем доверительной вероятности ($p = 0,0014$).

Ген *ABCB3* экспрессируется во всех клетках и, по сути, не имеет прямого отношения к множественной лекарственной устойчивости. Продукты гена *ABCB3* (*TAP2* – transporter antigen presentation, транспортёр представления антигена 1) и гена *ABCB2* (*TAP1*), соединяясь в гетеродимер, играют важную роль в транспортировке эндогенных пептидов из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум, где они объединяются вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости 1 класса (МНС I) для представления антигенов (<http://omim.org/entry/1702600>). По другим генам статистически значимой связи с возрастом пациентов не установлено.

Менструальный статус во многом является функцией возраста и также слабо связан с экспрессией АВС-транспортёров. Только экспрессия *ABCC2* до лечения оказалась выше у пациентов с сохранённым менструальным циклом, по сравнению с менопаузальными больными (таблица 5). Из литературных данных известно, что *ABCB1* показал связь на уровне тенденции с менструальным статусом в исследовании [Moureau-Zabotto L., et al., 2006], экспрессия была выше у больных с сохранённым менструальным циклом. В нашей работе у больных с пременопаузой экспрессия *ABCB1* также выше на уровне тенденции, $p < 0,01$ (таблица 5).

Размер опухоли ассоциирован с экспрессией ряда ABC-транспортеров в опухоли после проведения НАХТ (таблица 6). Экспрессия генов *ABCB1*, *ABCC1* и *ABCC2* после НАХТ выше у пациентов с большим размером опухоли (диаметром более 5 см – T₃₋₄), по сравнению с больными T₁₋₂. Экспрессия *ABCG2* выше у больных T₃₋₄ и до лечения и после НАХТ (таблица 6). Дополнительно экспрессия *ABCC5* и *MVP* после НАХТ связана с размером опухоли на уровне тенденции (p<0,1), т.е. практически все (6 из 9) исследованные гены показали связь с размером первичной опухоли.

Таблица 5. – Уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ в зависимости от возраста пациентов и менструального статуса

Гены	Точка	Больше 45 лет, n=75	Меньше 45 лет, n=45	p value	Мено-пауза, n=48	Премено-пауза, n=72	p value
<i>ABCB1</i>	До лечения	3,28±0,54	4,12±1,39	0,514	2,63±0,49	4,23±0,97	0,103
	После НАХТ	3,88±0,69	5,16±1,72	0,417	3,64±0,85	4,80±1,12	0,448
<i>ABCB3</i>	До лечения	0,71±0,07	1,24±0,17	0,001	0,85±0,11	0,96±0,11	0,515
	После НАХТ	0,68±0,09	0,89±0,32	0,433	0,72±0,14	0,78±0,19	0,833
<i>ABCC1</i>	До лечения	1,17±0,19	1,65±0,43	0,249	1,40±0,40	1,32±0,20	0,839
	После НАХТ	1,30±0,22	2,83±1,48	0,174	1,20±0,32	2,27±0,87	0,328
<i>ABCC2</i>	До лечения	2,72±0,49	4,23±1,05	0,147	2,03±0,41	4,13±0,78	0,040
	После НАХТ	4,08±0,92	5,20±1,17	0,464	3,19±0,79	5,35±1,09	0,142
<i>ABCC5</i>	До лечения	2,61±0,33	2,71±0,71	0,875	2,24±0,45	2,91±0,47	0,329
	После НАХТ	2,99±0,35	2,68±0,87	0,694	3,02±0,50	2,79±0,54	0,764
<i>ABCG1</i>	До лечения	2,11±0,50	2,20±0,54	0,904	1,91±0,50	2,30±0,53	0,607
	После НАХТ	1,52±0,32	1,61±0,52	0,869	1,35±0,36	1,69±0,39	0,544
<i>ABCG2</i>	До лечения	2,46±0,33	1,99±0,46	0,393	2,03±0,38	2,46±0,37	0,438
	После НАХТ	2,83±0,43	2,49±0,59	0,642	2,70±0,58	2,72±0,43	0,970
<i>MVP</i>	До лечения	0,52±0,09	0,43±0,06	0,451	0,60±0,13	0,42±0,05	0,124
	После НАХТ	0,64±0,13	0,38±0,08	0,178	0,61±0,17	0,51±0,10	0,585

Примечание: p value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

У больных с лимфогенным метастазированием уровень экспрессии гена *ABCC5* в опухоли до лечения и после НАХТ статистически значимо ниже, чем у пациентов без лимфогенных метастазов. На уровне тенденции экспрессия *MVP* у больных с лимфогенным метастазированием выше, чем у пациентов без метастазов (таблица 6).

У ER-положительных пациентов экспрессия гена *ABCG1* в опухоли до лечения и после НАХТ в 2 – 3 раза выше, чем у ER-негативных больных. Связь со статусом рецепторов прогестерона отмечается для гена *ABCG1* только после НАХТ (таблица 7).

Таким образом, только несколько генов до лечения показали связь с клинико-морфологическими параметрами: уровень *ABCB3* связан с возрастом, *ABCC2* с

менструальным статусом, *ABCG2* с размером опухоли, *ABCC5* с лимфогенным метастазированием и *ABCG1* с ER статусом. На наш взгляд, это большей частью случайные ассоциации, обусловленные большим количеством сравниваемых параметров. Это соответствует данным других авторов [Kaufmann M., et al., 2012, Keskin S., et al., 2011, Lacave R., et al., 1998, Moureau-Zabotto L., et al., 2006], и объясняет слабую ассоциацию клинико-патологических параметров с ответом на НАХТ.

Таблица 6. – Уровень экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ в зависимости от размера первичного опухолевого узла и лимфогенного метастазирования

Гены	Точка	T ₁₋₂ , n=106	T ₃₋₄ , n=14	p value	N ₀ , n=47	N ₁₋₃ , n=73	p value
<i>ABCB1</i>	До лечения	2,94±0,48	8,53±3,73	0,292	3,36±1,09	3,74±0,74	0,763
	После НАХТ	3,23±0,51	11,56±4,20	0,028	3,20±0,72	4,99±1,10	0,247
<i>ABCB3</i>	До лечения	0,94±0,09	0,67±0,24	0,180	0,81±0,11	0,98±0,12	0,316
	После НАХТ	0,78±0,14	0,52±0,16	0,444	0,83±0,29	0,71±0,09	0,631
<i>ABCC1</i>	До лечения	1,23±0,20	2,27±0,75	0,162	1,09±0,20	1,52±0,30	0,301
	После НАХТ	1,16±0,18	6,28±3,80	0,004	1,12±0,21	2,26±0,84	0,304
<i>ABCC2</i>	До лечения	2,98±0,52	5,62±1,68	0,083	3,01±0,69	3,47±0,70	0,655
	После НАХТ	3,93±0,76	7,98±2,00	0,005	4,00±0,81	4,74±1,05	0,619
<i>ABCC5</i>	До лечения	2,66±0,36	2,47±0,90	0,837	3,62±0,75	1,99±0,22	0,017
	После НАХТ	2,72±0,39	4,25±1,23	0,084	3,79±0,81	2,32±0,33	0,056
<i>ABCG1</i>	До лечения	2,20±0,41	1,68±0,88	0,221	1,55±0,24	2,52±0,59	0,208
	После НАХТ	1,48±0,26	2,01±1,14	0,322	1,34±0,25	1,68±0,41	0,547
<i>ABCG2</i>	До лечения	2,03±0,27	4,17±1,00	0,025	2,63±0,46	2,06±0,33	0,311
	После НАХТ	2,25±0,30	5,80±1,51	0,005	2,93±0,56	2,58±0,44	0,625
<i>MVP</i>	До лечения	0,51±0,06	0,35±0,12	0,150	0,36±0,05	0,58±0,09	0,073
	После НАХТ	0,59±0,10	0,26±0,08	0,081	0,42±0,08	0,63±0,14	0,288

Примечание: p value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Ассоциации экспрессии генов МЛЮ с клинико-морфологическими параметрами до лечения носят противоречивый и случайный характер. Так в исследовании Moureau-Zabotto et al., (2006), как и в нашей работе, не было показано связи экспрессии генов *ABCB1* и *ABCC1* с возрастом пациентов [Moureau-Zabotto L., et al., 2006]. В исследовании Filipits et al (2005) также не установлено связи экспрессии гена *ABCC1* с возрастом больных РМЖ [Filipits M., et al., 2005].

Kim et al (2013) показал только положительную корреляцию между возрастом и экспрессией Р-гликопротеина (продукта гена *ABCB1*) с другими параметрами экспрессия белков МЛЮ не коррелировала [Kim B., et al., 2013]. Напротив, Victor Hlavac et al (2013) показал отрицательную корреляцию *ABCB1* с возрастом (R=-0,320, p = 0,008) и связь с

менструальным статусом ($p = 0,026$) [Hlavac V., et al., 2013]. *ABCC1* был выше у пациентов ER-, чем у ER+ больных [Hlavac V., et al., 2013].

Таблица 7. – Уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ в зависимости от статуса рецепторов эстрогена и прогестерона

Гены	Точка	ER+, n=61	ER-, n=52	p value	PR+, n=60	PR-, n=53	p value
<i>ABCB1</i>	До лечения	3,30±0,82	3,83±1,05	0,688	3,42±0,84	3,69±1,02	0,833
	После НАХТ	3,95±0,93	4,60±1,28	0,678	4,63±1,22	3,77±0,85	0,581
<i>ABCB3</i>	До лечения	0,99±0,13	0,85±0,12	0,411	0,96±0,12	0,89±0,12	0,688
	После НАХТ	0,89±0,22	0,68±0,12	0,430	0,80±0,22	0,77±0,13	0,886
<i>ABCC1</i>	До лечения	1,39±0,32	1,37±0,27	0,962	1,21±0,20	1,58±0,39	0,383
	После НАХТ	2,40±1,03	1,31±0,24	0,334	2,51±1,00	1,13±0,20	0,223
<i>ABCC2</i>	До лечения	3,04±0,70	3,56±0,81	0,627	3,62±0,86	2,89±0,58	0,494
	После НАХТ	3,76±0,85	5,30±1,30	0,312	4,38±1,19	4,59±0,85	0,894
<i>ABCC5</i>	До лечения	2,68±0,53	2,55±0,46	0,855	2,78±0,53	2,44±0,45	0,628
	После НАХТ	3,21±0,64	2,43±0,40	0,322	3,10±0,61	2,54±0,44	0,479
<i>ABCG1</i>	До лечения	2,56±0,54	1,19±0,21	0,030	2,23±0,46	1,59±0,43	0,311
	После НАХТ	2,23±0,50	0,77±0,15	0,009	2,16±0,49	0,83±0,16	0,019
<i>ABCG2</i>	До лечения	1,90±0,35	2,75±0,46	0,139	1,94±0,35	2,69±0,46	0,190
	После НАХТ	2,41±0,41	3,03±0,61	0,389	2,22±0,36	3,29±0,66	0,137
<i>MVP</i>	До лечения	0,51±0,05	0,48±0,12	0,815	0,44±0,05	0,55±0,12	0,387
	После НАХТ	0,48±0,08	0,63±0,19	0,456	0,54±0,11	0,56±0,17	0,925

Примечание: p value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

С размером опухолевого узла коррелировала экспрессия *ABCC1* [Filipits M., et al., 2005]. В то же время в работе Moureau-Zabotto et al., (2006) показана отрицательная корреляция экспрессии *ABCC1* и размера опухолевого узла [Moureau-Zabotto L., et al., 2006]. В исследовании японских ученых не было установлено никакой связи экспрессии ABC-транспортеров (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP*) с размером опухоли, лимфогенным и гематогенным метастазированием, рецепторным статусом и возрастом 43 больных РМЖ [Kanzaki A., et al., 2001]. Исследование экспрессии белков Авсс1 и Pgr до лечения в опухоли 177 пациентов не показало связи с лимфогенным метастазированием, размером опухоли, степенью злокачественности и ER-статусом [Larkin A., et al., 2004]. Экспрессия белка *ABCC2* не коррелировала с возрастом, размером опухоли, лимфогенным метастазированием и рецепторным статусом в исследовании операционного материала 70 больных РМЖ, не получавших предоперационную терапию [Maciejczyk A., et al., 2012]. Французские ученые не отметили связи экспрессии генов *ABCB1* и *ABCC1* в опухоли без НАХТ 74 больных РМЖ с основными клинико-морфологическими параметрами [Lacave R., et al., 1998]. Исследования 90 больных РМЖ не показали связь экспрессии *ABCB1* с

основными клинико-морфологическими параметрами [Vaclavikova R., et al., 2008]. С помощью микроматричных исследований был продемонстрирован стабильно высокий уровень экспрессии *ABCВ3* в операционном материале опухоли молочной железы, который не зависел от распространенности процесса, проведения НАХТ и ее эффекта [Gillet J.P. S.J., Bertholet V., De Longueville F., Remacle J., Efferth T, 2006]. В Словакии было обследовано 87 больных РМЖ и оценена связь экспрессии в опухоли белков Р-гликопротеина, *ABCC1* и *Mvp* с основными клинико-морфологическими параметрами. Была установлена только отрицательная корреляция рецепторного статуса (ER и PR) с экспрессией Р-гликопротеина, другие параметры не были связаны с экспрессией ABC-транспортеров [Rybarova S., et al., 2005].

Согласно полученным данным размер опухоли связан с экспрессией ABC-транспортеров. Известно, что размер опухоли T показывает ассоциацию с эффектом НАХТ, хотя с низким уровнем доверительной вероятности [Rouzier R., et al., 2002, Smith I.C., et al., 2002, Tiezzi D.G., et al., 2007]. В исследовании китайских авторов [Zhang B., et al., 2006] показано, что размер опухоли менее 3 см ассоциировался с ответом на НАХТ (n=160), однако уровень значимости, при проведении логистического регрессионного анализа, не превышал 0,03. Кроме того, хорошо известно, что показатель T связан также с прогнозом РМЖ, прогноз ухудшается с увеличением размера опухоли [Kaufmann M., et al., 2012].

Таким образом, литературные данные показывают, что размер опухоли является достаточно важным клиническим параметром, который связан с прогнозом и с непосредственным ответом на предоперационную химиотерапию. В нашем исследовании экспрессия 6 (2 на уровне тенденции) из 9 ABC-транспортеров в опухоли молочной железы после НАХТ (но не до лечения) была связана с размером первичной опухоли. У больных с T₃₋₄ экспрессии генов ABC была выше в опухоли после НАХТ, чем у больных T₁₋₂ т.е. изменение экспрессии генов МЛУ в ответ на воздействие химиопрепаратов ассоциировано с объемом опухоли до лечения.

3.2. Экспрессия ABC-транспортеров у больных с различной эффективностью неoadьювантной химиотерапии

На первом этапе было проведено сравнение уровня экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ у больных с объективным клиническим ответом на НАХТ (Частичная регрессия+Полная регрессия, n = 73) и у пациентов, не ответивших на предоперационную химиотерапию (Стабилизация+Прогрессирование, n = 47). Результаты сравнения представлены в таблице 8. Средние уровни экспрессии практически всех изученных генов до лечения не различались у пациентов с объективным клиническим ответом на НАХТ и отсутствием ответа (таблица 8). Это согласуется с данными клинических исследований многочисленных авторов, которые также не могли установить ясной связи базального уровня экспрессии белков и генов ABC-транспортеров и эффекта неoadьювантной химиотерапии (таблица 9). Только несколько авторов (таблица 9) и результаты мета-анализа В.Ж. Trock (1997) позволили показать статистически значимую связь исходного уровня экспрессии Р-гликопротеина и эффекта НАХТ [Trock В.Ж., et al., 1997]. Однако, мета-анализы, проведенные позже – в 2003 и 2005 годах не подтвердили эти данные 1997 года и не установили четкой связи экспрессии Р-гликопротеина до лечения с эффектом химиотерапии [Clarke R., et al., 2005, Leonessa F., et al., 2003]. Эти данные поддержаны в обзоре Wind and Holen (2011) [Wind N., et al., 2011], авторы которого говорят о гетерогенности клинической значимости экспрессии белков и генов ABC-транспортеров. Таким образом, наши исследования и множество литературных источников свидетельствуют о том, что в клинических условиях для рака молочной железы предсуществующая множественная лекарственная устойчивость, обусловленная экспрессией ABC-транспортеров, не играет существенной роли в механизмах устойчивости опухоли к химиотерапии. И это, несмотря на множество данных *in vitro* о значении изначально высокой экспрессии ABC-транспортеров в резистентности клеток карциномы молочной железы (MCF7 и др.) к цитостатическим препаратам [Allen J.D., et al., 2000, Gottesman M.M., et al., 2006, Hembruff S.L., et al., 2008, Kool M., et al., 1997].

Из всех ABC-транспортеров, только уровень экспрессии гена *ABCB3* в опухоли до лечения различался у больных с объективным ответом и отсутствием ответа на НАХТ. статистически значимо уровень *ABCB3* и был статистически значимо выше у больных с объективным клиническим ответом (таблица 8).

Таблица 8. – Уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ в зависимости от эффекта предоперационной химиотерапии.

Гены	Точка	Стабилизация+ Прогрессирование, n=48	Полная+Частичная регрессия, n=72	p value
<i>ABCB1</i>	До лечения	3,32±0,74	4,41±0,95	0,413
	После НАХТ	5,56±1,14	2,68±0,53	0,017
<i>ABCB3</i>	До лечения	0,62±0,09	1,09±0,12	0,004
	После НАХТ	0,60±0,10	0,87±0,21	0,286
<i>ABCC1</i>	До лечения	1,41±0,29	1,34±0,27	0,867
	После НАХТ	2,79±1,18	1,01±0,18	0,099
<i>ABCC2</i>	До лечения	3,62±0,78	3,10±0,66	0,609
	После НАХТ	6,15±1,35	2,99±0,70	0,030
<i>ABCC5</i>	До лечения	2,58±0,34	2,69±0,50	0,882
	После НАХТ	3,90±0,74	2,12±0,33	0,019
<i>ABCG1</i>	До лечения	1,39±0,37	2,60±0,55	0,115
	После НАХТ	2,15±0,54	1,05±0,24	0,047
<i>ABCG2</i>	До лечения	2,27±0,40	2,29±0,36	0,976
	После НАХТ	3,50±0,57	2,07±0,42	0,041
<i>MVP</i>	До лечения	0,41±0,05	0,54±0,09	0,299
	После НАХТ	0,73±0,14	0,43±0,13	0,115

Примечание: p value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Ген *ABCB3* экспрессируется во всех клетках и, по сути, не имеет прямого отношения к множественной лекарственной устойчивости. Как уже указывалось выше *ABCB3* (*TAP2*), , играет важную роль в транспортировке эндогенных пептидов из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум, где они объединяются вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости 1 класса (МНС I) для представления антигенов (<http://omim.org/entry/1702600>).

Таблица 9. – Литературные данные о связи уровня экспрессии ABC-транспортеров с эффектом НАХТ

<u>Нет связи</u> с эффектом НАХТ	[Bottini A., et al., 2000, Clarke R., et al., 2005, Dixon A., et al., 1992, Faneyte I.F., et al., 2002, Faneyte I.F., et al., 2001, Faneyte I.F., et al., 2004, Faneyte I.F., et al., 2003, Kim B., et al., 2013, Leonessa F., et al., 2003, Park S., et al., 2006, Schneider J., et al., 2001, Szakács G., et al., 2004, Wang C.S., et al., 1997, Wind N., et al., 2011]
<u>Есть связь</u> с эффектом НАХТ	[Trock B.J., et al., 1997, Atalay C., 2008, Chintamani, et al., 2005, Singh L.C., et al., 2012]

Park с коллегами показали высокую экспрессию гена *ABCB3* в опухоли больных РМЖ с полной регрессией опухоли, получавших НАХТ [Park S., et al., 2006]. С помощью микроматричных исследований был продемонстрирован стабильно высокий средний

уровень экспрессии *ABCB3* в операционном материале опухоли молочной железы, который не зависел от распространенности процесса, проведения НАХТ и ее эффекта [Gillet J.P. S.J., Bertholet V., De Longueville F., Remacle J., Efferth T, 2006].

Уровень экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1* и *ABCG2* в опухоли после проведения НАХТ статистически значимо различается в группах с объективным ответом и отсутствием ответа на лечения (таблица 8). В группе с объективным ответом экспрессия данных генов значительно ниже (в 1,5-2 раза), чем у больных со стабилизацией или прогрессированием. По гену *ABCC1* различия экспрессии после НАХТ между группами на уровне тенденции ($p < 0,1$).

Изначально, у больных с объективным ответом и отсутствием ответа экспрессия ABC-транспортеров до лечения не различается, но после проведения НАХТ происходит дивергенция групп по уровню экспрессии генов в операционном материале опухоли после НАХТ. У ответивших пациентов экспрессия низкая, а у не ответивших больных – экспрессия высокая. Исходя из такой дивергентной картины, мы предположили, что происходит разнонаправленное изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. У больных с объективным ответом происходит снижение экспрессии генов ABC в опухоли, у больных с отсутствием ответа – повышение экспрессии. Чтобы статистически доказать так ли это, было проведено сравнение экспрессии ABC-транспортеров в пробах до лечения и после НАХТ отдельно у больных с объективным ответом и отсутствие такового. На рисунке 10 представлен уровень экспрессии генов МЛУ в группах с объективным ответом (рисунок 10А) и отсутствием ответа (рисунок 10Б). При этом для того, чтобы показать что изменение экспрессии происходит индивидуально у пациентов, для сравнения экспрессии до лечения и после НАХТ использовали непараметрический критерий Вилкоксона для связанных групп. При этом из анализа пришлось удалить данные 14 больных с полной морфологической регрессией, поскольку у них ввиду отсутствия опухоли в операционных образцах после НАХТ не измерялась экспрессия генов ABC.

Как видно на рисунке, если разделить больных на группы в зависимости от эффективности НАХТ, то индивидуально у пациентов экспрессия практически всех изученных генов ABC в образцах до лечения и после НАХТ статистически значимо различается. При этом у больных с объективным ответом происходит снижение экспрессии ABC-транспортеров в процессе системной химиотерапии (рисунок 12А), а у больных с отсутствием ответа на НАХТ наблюдается статистически значимое повышение экспрессии ABC-транспортеров в ответ на воздействие химиопрепаратов (рисунок 12Б). Средние значения экспрессии изученных генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1*,

ABCG2 и *MVP* были ниже после НАХТ у больных с объективным ответом (рисунок 12А), тогда как у пациентов с устойчивостью к химиотерапии отмечается увеличение уровня экспрессии большинства генов в ткани опухоли ($10^{-6} < p < 0,04$) (рисунок 12Б). Для примера, изменения экспрессии гена *ABCB1* индивидуально у пациентов представлены на рисунке 12В, хорошо видно и повышение, и снижение в процессе НАХТ экспрессии *ABCB1* в опухолевой ткани.

Таким образом, мы статистически доказали, что у больных с объективным ответом на НАХТ наблюдается снижение экспрессии генов ABC-транспортёров, а у больных с отсутствием ответа происходит повышение экспрессии генов ABC. Эффект химиотерапии связан не с уровнем экспрессии генов ABC до лечения (предсуществующей МЛУ), а с изменением их экспрессии в опухолевой ткани в процессе лечения (адаптивной МЛУ).

Для подтверждения связи эффекта НАХТ и изменения экспрессии генов ABC-транспортёров был проведен анализ связи частоты случаев снижения или повышения экспрессии с эффектом НАХТ. Для этого количественные данные, по уровню экспрессии ABC генов в образцах опухоли до лечения и после НАХТ, были заменены на качественные данные. Если экспрессия в образце до лечения была ниже, чем в операционном материале после НАХТ, то говорили о повышении экспрессии гена у данного больного. В случае, если экспрессия до лечения была выше, чем в операционном материале, то говорили о снижении экспрессии гена у данного больного, отсутствие экспрессии гена в обоих образцах также приравнивали к снижению экспрессии. В таблице 10 представлены результаты, показывающие связь направления изменения экспрессии генов ABC и эффекта НАХТ.

В таблице видно, что при анализе качественных данных также статистически значимо устанавливается связь направления изменения экспрессии ABC-транспортёров и эффективности НАХТ (таблица 10). У пациенток с объективным клиническим ответом в опухоли снижается экспрессия генов ABC в 61-84% случаев, а у пациенток с отсутствием ответа в процессе проведения химиотерапии повышается экспрессия этих генов в опухоли в 63-88% случаев ($0,02 < p < 1,1 \times 10^{-12}$). Связь эффекта НАХТ с изменением экспрессии ABC-транспортёров подтверждают результаты логистического регрессионного анализа в котором эффективность НАХТ выступала в качестве зависимой бинарной переменной. Логистический регрессионный анализ продемонстрировал сильную связь между изменениями экспрессии каждого из генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1*, *ABCG2*, *MVP* с ответом на НАХТ (OR=4,98 – 38,1 (*ABCC1* и *ABCB1*); $0,00008 < p < 10^{-14}$).

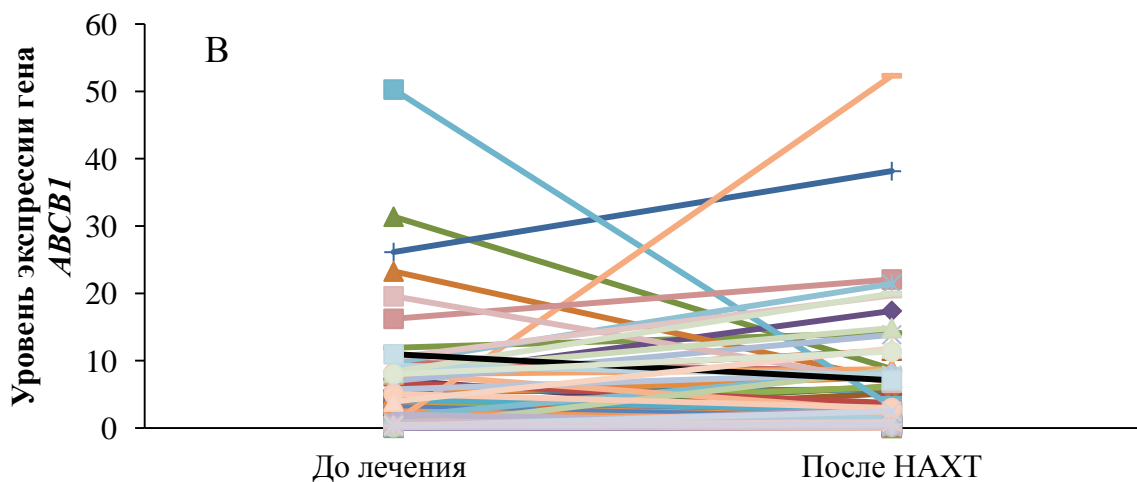
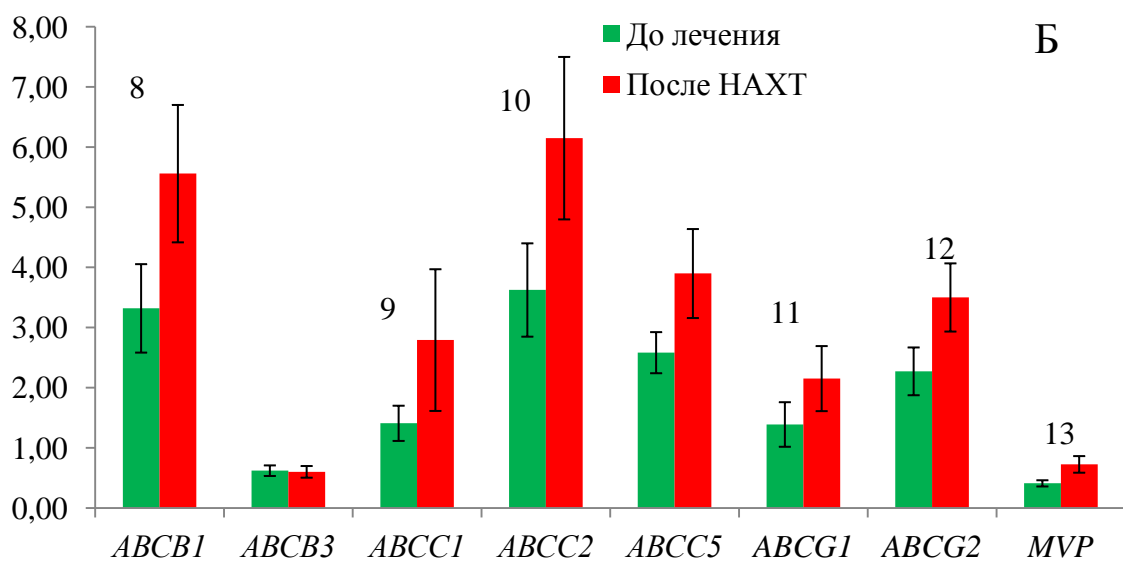
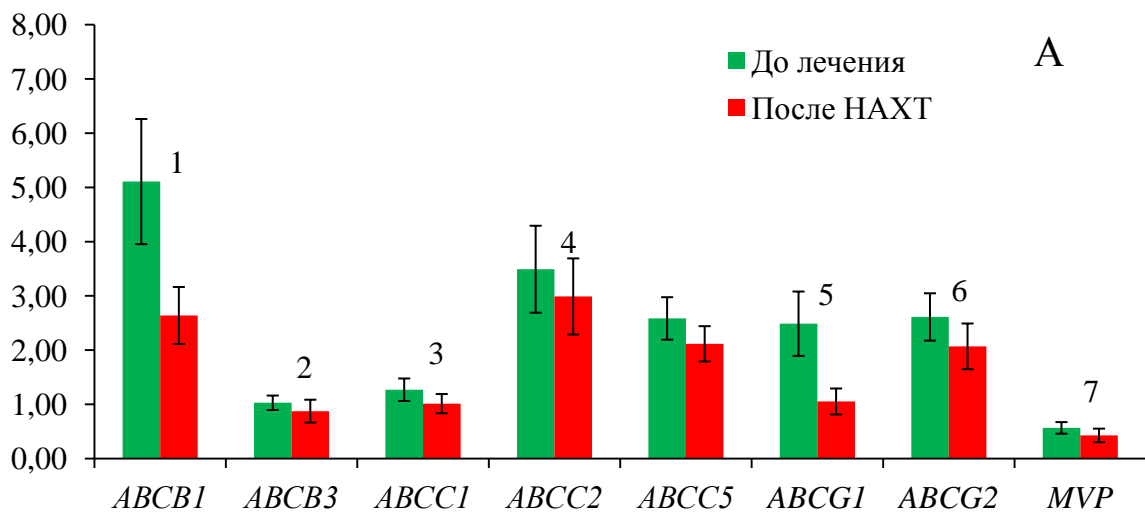


Рисунок 12. – Сравнение уровней экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы, до лечения и после НАХТ, отдельно в группах с объективным ответом (А, n=58) и с отсутствием ответа на НАХТ (Б, n=48). В – Изменение экспрессии гена *ABCB1* в процессе НАХТ. Уровень экспрессии (средняя±стандартная ошибка (M±SE)). Статистический анализ p-value – по критерию Вилкоксона для связанных групп: 1- $p=1,17 \times 10^{-7}$; 2- $p=0,008$; 3- $p=0,02$ 4- $p=0,001$; 5- $p=0,00001$; 6- $p=0,0000003$; 7- $p=0,00005$; 8- $p=1,51 \times 10^{-7}$; 9- $p=0,009$; 10- $p=0,004$; 11- $p=0,02$; 12- $p=0,00001$; 13- $p=0,03$. Для *ABCC5* в обеих группах p-value на уровне тенденции ($< 0,1$).

Таблица 10. – Изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе химиотерапии и эффективность НАХТ

Ген	Эффективность НАХТ				p-value
	Объективный ответ		Отсутствие ответа		
	Снижение экспрессии	Повышение экспрессии	Снижение экспрессии	Повышение экспрессии	
<i>ABCB1</i>	49 (84%)	9 (16%)	6 (12%)	42 (88%)	1,1x10⁻¹²
<i>ABCB3</i>	42 (74%)	15 (26%)	26 (56%)	20 (44%)	0,094
<i>ABCC1</i>	39 (67%)	19 (33%)	14 (29%)	34 (71%)	0,0002
<i>ABCC2</i>	44 (76%)	14 (24%)	13 (27%)	35 (73%)	6,5x10⁻⁷
<i>ABCC5</i>	35 (61%)	22 (39%)	17 (37%)	29 (63%)	0,018
<i>ABCG1</i>	48 (83%)	10 (17%)	16 (35%)	30 (65%)	7,1x10⁻⁷
<i>ABCG2</i>	47 (81%)	11 (19%)	9 (19%)	39 (81%)	1,0x10⁻¹⁰
<i>MVP</i>	47 (81%)	11 (19%)	15 (33%)	30 (67%)	0,000001

Статистический анализ: p-value – по двустороннему критерию Фишера <http://vassarstats.net/odds2x2.html>, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Таким образом, нами была впервые установлена и подтверждена несколькими видами анализов связь изменения экспрессии генов ABC-транспортеров в опухолевой ткани молочной железы в процессе лечения с эффектом НАХТ. Фактически установлены феномены индивидуального повышения или снижения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении химиотерапии и связь ответа на химиотерапию с этими изменениями экспрессии, т.е. наши исследования четко показали, что в реализации эффекта НАХТ играет роль не предсуществующая, а адаптивная (изменяемая в процессе лечения) множественная лекарственная устойчивость.

В таблице 11 представлена частота повышения (N1) или снижения (N2) экспрессии генов ABC-транспортеров при проведении НАХТ в зависимости от основных клинко-морфологических параметров. При мультицентричном раке молочной железы для генов *ABCB1* и *ABCC2* показано статистически значимо более высокая частота повышение экспрессии в процессе НАХТ по сравнению с уницентричным РМЖ. Негативный HER2 статус также связан с более частым повышением экспрессии *ABCB1* по сравнению с HER2-позитивными пациентами. У больных в возрасте менее 45 лет экспрессия *ABCB3* снижается чаще, чем у больных в возрасте более 45 лет. По другим клинко-морфологическим параметрам не установлено значимых различий. Установленные статистические различия в большей степени носят разрозненный, случайный характер и можно констатировать, что в результате анализа не установлено значимых для изменения экспрессии ABC-транспортеров клинко-морфологических параметров. Поскольку изменение экспрессии ABC-транспортеров в процессе химиотерапии определяет ответ опухоли молочной железы на НАХТ, а клинко-морфологические параметры не связаны с

изменением экспрессии, то можно сказать, что клинико-морфологические параметры не могут быть использованы для прогноза ожидаемой эффективности НАХТ. Собственно, наши результаты и не показали связи основных клинико-морфологических параметров с эффектом НАХТ (таблица 12). Это согласуется с результатами многих исследований, которые пытались связать клинико-морфологические параметры и эффективность НАХТ.

Таблица 11. – Изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе химиотерапии в зависимости от клинико-морфологических параметров

Клинико-патологические параметры		N1/N2			
		<i>ABCB1</i>	<i>ABCB3</i>	<i>ABCC1</i>	<i>ABCC2</i>
Возраст (лет)	Менее 45	16/20 (44/56)	6/29 (17/83)	15/21 (42/58)	15/21 (42/58)
	Более 45	35/35 (50/50)	30/38 (44/56)	38/32 (54/46)	34/36 (49/51)
	p-value	0,683	0,009	0,305	0,542
Размер опухоли	T ₁₋₂	43/49 (47/53)	32/60 (35/65)	45/47 (49/51)	40/52 (43/57)
	T ₃₋₄	8/6 (57/43)	4/7 (31/69)	8/6 (57/43)	9/5 (64/36)
	p-value	0,570	0,580	0,775	0,163
Лимфогенное метастазирование	N ₀	18/21 (46/54)	15/24 (38/62)	19/20 (49/51)	18/21 (46/54)
	N ₁₋₃	33/34 (49/51)	21/43 (33/67)	34/33 (51/49)	31/36 (46/54)
	p-value	0,841	0,671	1,0	1,0
Менструальный статус	Пременопауза	29/33 (47/53)	19/42 (31/69)	33/29 (53/47)	29/33 (47/53)
	Постменопауза	22/22 (50/50)	17/25 (40/60)	20/24 (45/55)	20/24 (45/55)
	p-value	0,844	0,402	0,555	1,0
Гистологическая форма	Униполярный	28/44 (39/61)	22/48 (31/69)	31/41 (43/57)	28/44 (39/61)
	Мультиполярный	23/11 (68/32)	14/19 (42/58)	22/12 (65/35)	21/13 (62/38)
	p-value	0,007	0,376	0,060	0,037
Рецепторы эстрогенов	Позитивный	28/26 (52/48)	22/30 (42/58)	32/22 (59/41)	24/30 (44/56)
	Негативный	20/26 (43/57)	14/31 (31/69)	19/27 (41/59)	22/24 (48/52)
	p-value	0,429	0,296	0,108	0,841
Рецепторы прогестерона	Позитивный	28/28 (50/50)	19/35 (35/65)	33/23 (59/41)	25/31 (45/55)
	Негативный	20/24 (45/55)	17/26 (40/60)	18/26 (41/59)	21/23 (48/52)
	p-value	0,691	0,678	0,107	0,841
Рецепторы HER2	++/+++	9/19 (32/68)	9/19 (32/68)	10/18 (36/64)	14/14 (50/50)
	Негативный	39/32	27/41	41/30	32/39

		(55/45)	(40/60)	(58/42)	(45/55)
	p-value	0,047	0,643	0,073	0,823
Молекулярный подтип	1. Люминальный В	31/32 (49/51)	22/39 (36/64)	34/29 (54/46)	26/37 (41/59)
	2. Трижды негативный	11/13 (46/54)	9/14 (39/61)	10/14 (42/58)	10/14 (42/58)
	3. HER2+	7/10 (41/59)	5/12 (29/71)	7/10 (41/59)	11/6 (65/35)
	p-value1-2	0,814	0,805	0,345	1,0
	p-value1-3	0,596	0,775	0,418	0,105
	p-value2-3	1,0	0,739	1,0	0,208

Продолжение таблицы 11.

Клинико-патологические параметры		N1/N2			
		<i>ABCC5</i>	<i>ABCG1</i>	<i>ABCG2</i>	<i>MVP</i>
Возраст (лет)	≤45	13/22 (37/63)	11/23 (50/50)	13/23 (44/56)	12/22 (49/51)
	>45	38/30 (56/44)	29/41 (41/59)	37/33 (53/47)	29/40 (42/58)
	p-value	0,096	0,399	0,149	0,530
Размер опухоли	T ₁₋₂	43/49 (47/53)	34/56 (47/53)	41/51 (35/65)	36/54 (43/57)
	T ₃₋₄	8/3 (73/27)	6/8 (43/57)	9/5 (64/36)	5/8 (64/36)
	p-value	0,122	0,772	0,251	1,0
Лимфогенное метастазирование	N ₀	20/19 (51/49)	15/23 (39/61)	18/21 (46/54)	18/20 (47/53)
	N ₁₋₃	31/33 (48/52)	25/41 (38/62)	32/35 (48/52)	23/42 (34/66)
	p-value	0,840	1,0	1,0	0,297
Менструальный статус	Пременопауза	29/32 (47/53)	22/38 (37/63)	27/35 (43/57)	23/37 (38/62)
	Постменопауза	22/20 (52/48)	18/26 (41/59)	23/21 (52/48)	18/25 (42/58)
	p-value	0,691	0,844	0,432	0,839
Гистологическая форма	Униполярный	32/38 (46/54)	26/44 (37/63)	31/41 (43/57)	24/45 (35/65)
	Мультиполярный	19/14 (58/42)	14/20 (41/59)	19/15 (56/44)	17/17 (50/50)
	p-value	0,296	0,830	0,297	0,199
Рецепторы эстрогенов	Позитивный	28/24 (54/46)	21/32 (40/60)	30/24 (56/44)	21/31 (40/60)
	Негативный	20/25 (44/56)	17/28 (38/62)	17/29 (37/63)	19/26 (42/58)
	p-value	0,418	1,0	0,073	1,0
Рецепторы прогестерона	Позитивный	29/25 (54/46)	22/32 (41/59)	27/29 (48/52)	23/30 (43/57)
	Негативный	19/24 (44/56)	16/28 (45/55)	20/24 (40/60)	17/27 (39/61)
	p-value	0,416	0,682	0,842	0,682
Рецепторы HER2	++/+++	12/16 (43/57)	8/19 (29/71)	9/19 (32/68)	12/15 (44/56)

	Негативный	36/32 (53/47)	30/40 (43/57)	38/33 (54/46)	28/41 (41/59)
	p-value	0,501	0,256	0,074	0,819
Молекулярный подтип	1. Люминальный В	33/28 (53/47)	23/39 (37/63)	32/31 (51/49)	24/37 (39/61)
	2. Трижды негативный	11/12 (48/52)	11/13 (46/54)	10/14 (42/58)	10/14 (42/58)
	3. HER2+	6/11 (35/65)	5/11 (31/69)	6/11 (32/68)	7/9 (44/56)
	p-value1-2	0,633	0,472	0,481	1,0
	p-value1-3	0,273	0,775	0,287	0,781
	p-value2-3	0,525	0,512	0,753	1,0

Примечание: p-value по двустороннему критерию Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>), полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Такие клиничко-морфологические параметры как гистологический тип опухоли, степень злокачественности, слабо ассоциированы с эффективностью НАХТ [Rouzier R., et al., 2002, Tiezzi D.G., et al., 2007]. Размер опухоли, лимфогенное метастазирование ассоциированы с эффективностью НАХТ, но показывают низкий уровень значимости на ограниченных выборках. При T_xN_0 с большей вероятностью достигается объективный ответ на НАХТ, чем при T_xN_{1-2} ($p=0,04-0,003$) [Rouzier R., et al., 2002, Smith I.C., et al., 2002, Tiezzi D.G., et al., 2007]. В исследовании китайских авторов [Zhang B., et al., 2006] показано, что размер опухоли менее 3 см ассоциировался с ответом на НАХТ ($n=160$), однако уровень значимости, при проведении логистического регрессионного анализа, не превышал 0,03.

Иммуногистохимические показатели экспрессии в опухоли гормональных рецепторов (ER и PR), белков p53, p21 и рецептора эпидермального фактора роста (HER2) не коррелируют с эффективностью НАХТ [Tiezzi D.G., et al., 2007]. В исследовании [Lee J., et al., 2008] из всех изученных иммуногистохимических показателей опухоли молочной железы (ER, PR, HER2, Ki-67) только Ki-67 показал ассоциацию с эффективностью адриомидин/доцетаксел НАХТ и общей выживаемостью (уровень значимости 0,033). В других исследованиях [Fernandez-Sanchez M., et al., 2006, Learn P.A., et al., 2005, Zhang F., et al., 2003] уровень экспрессии HER2 ассоциировался с ответом на НАХТ, но эта взаимосвязь сильно зависит от схемы химиотерапии и не является универсальной.

Таким образом, клиничко-морфологические параметры не связаны с регуляцией экспрессии генов ABC-транспортёров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ.

Повышение экспрессии генов МЛУ является нормальной реакцией клеток (в том числе и опухолевых) в ответ на химиопрепараты, исходя из физиологической функции ABC-

транспортеров [Schinkel A.H., et al., 2012], и потому феномен повышения экспрессии этих генов в процессе химиотерапии широко известен в литературе.

Таблица 12. – Связь основных клинико-морфологических параметров с эффективностью НАХТ

Клинико-патологические параметры		Объективный ответ на НАХТ	Нет ответа	p-value
Возраст (лет)	Менее 45	29(40)	16(33)	0,564
	Более 45	43(60)	32(77)	
Размер опухоли	T ₁₋₂	64(89)	42(88)	1,0
	T ₃₋₄	8(11)	6(12)	
Лимфогенное метастазирование	N ₀	30(42)	17(35)	0,455
	N ₁₋₃	42(58)	32(65)	
Менструальный статус	Пременопауза	44(61)	28(58)	0,849
	Постменопауза	28(39)	20(42)	
Гистологическая форма	Униполярный	55(76)	30(63)	0,151
	Мультиполярный	17(24)	18(37)	
Рецепторы эстрогенов	Позитивный	32(48)	29(63)	0,127
	Негативный	35(52)	17(37)	
Рецепторы прогестерона	Позитивный	31(46)	29(63)	0,088
	Негативный	36(54)	17(37)	
Рецепторы HER2	++/+++	20(30)	9(20)	0,273
	Негативный	46(70)	37(80)	
Молекулярный подтип	Люминальный В	39(54)	32(68)	0,340
	Трижды негативный	21(30)	9(19)	
	HER2+	11(26)	6(13)	

Примечание: p-value по двустороннему критерию Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>)

Здесь мы, в основном, представили клинические данные, полученные на опухоли молочной железы. Ассоциацию повышения экспрессии генов МЛУ с отсутствием эффекта НАХТ подтверждают результаты исследования Chevillard et al., (1996)

В мета-анализе В.Ж. Trock, [1997] было продемонстрировано повышение экспрессии Р-гликопротеина в опухоли молочной железы в ответ на НАХТ [Trock В.Ж., et al., 1997]. Мета-анализ 2003 года показал, что после НАХТ повышалась частота ABC-положительных опухолей. Больные не отвечали на лечение, если экспрессия Р-гликопротеина отмечалась после НАХТ [Leonessa F., et al., 2003]. Аналогичные данные показал и более поздний мета-анализ 2005 года экспрессия Р-гликопротеина повышалась в процессе НАХТ, при этом повышение экспрессии Р-гликопротеина коррелировало с отсутствием ответа на НАХТ [Clarke R., et al., 2005].

Chintamani et al., (2005) показали увеличение частоты экспрессии Р-гликопротеина с 52% больных РМЖ, до 73,5% пациентов после НАХТ [Chintamani, et al., 2005]. Atalay в

2006 году показал, что у пациентов, у которых в процессе НАХТ индуцировалась экспрессии гена *ABCB1*, отсутствовал ответ на химиотерапию [Atalay C., 2006]. Singh и соавторы [Singh L.C., et al., 2012] продемонстрировали увеличение экспрессии гена *ABCB1* в опухоли молочной железы после НАХТ. В исследовании Rudas et al., (2003) отмечалось повышения частоты экспрессии Р-гликопротеина с 54% опухолей до лечения до 100% опухолей после НАХТ. Отмечалось также повышение частоты экспрессии *ABCC1* и *MVP* в опухолях молочной железы после НАХТ с 62% до 88% и с 66% до 97% соответственно [Rudas M., et al., 2003]. Повышение экспрессии генов и белков ABC было не раз продемонстрировано и в других работах *in vitro* и других клинических исследованиях [Allen J.D., et al., 2000, Gottesman M.M., et al., 2006, Hembruff S.L., et al., 2008, Kool M., et al., 1997, Szakács G., et al., 2004], [Fletcher J.I., et al., 2010, Kuo M.T., 2007, Leonessa F., et al., 2003, Wind N., et al., 2011]. В большинстве клинических исследований определялась экспрессия крайне ограниченного круга генов и белков ABC. Как правило, исследования ограничивались Р-гликопротеином и геном *ABCB1*, в редких случаях исследования касались отдельных белков и генов семейства ABCC и G, но обычно не более двух-трех ABC-транспортёров. Мы впервые продемонстрировали, что повышение экспрессии генов ABC-транспортёров в процессе химиотерапии является универсальным феноменом, характерным для всех основных генов ABC, и повышение экспрессии определяет формирование адаптивной МЛУ и резистентность опухоли молочной железы к химиопрепаратам.

Возможность снижения экспрессии генов МЛУ в процессе химиотерапии является неоднозначным фактом, который вызывает удивление, значительно расходится с общепринятыми понятиями и поэтому требует подробного анализа и объяснения, прежде всего потому, что снижение экспрессии не является физиологической (нормальной) клеточной реакцией на ксенобиотики, а, по-видимому, атрибутом аберрантных опухолевых клеток.

В мировой литературе подтверждение самой возможности снижения экспрессии генов и белков МЛУ в опухоли при химиотерапии, найти оказалось достаточно трудно. Всего несколько работ продемонстрировали *in vivo* такую возможность: в микрочиповых исследованиях Gillet et al (2006) показал уменьшение уровня экспрессии некоторых генов МЛУ в опухолях пациентов после НАХТ по антрациклин-содержащим схемам, по сравнению с опухолями не леченых пациентов [Gillet J.P. S.J., Bertholet V., De Longueville F., Remacle J., Efferth T, 2006]. Faneyte I.F., et al (2004) на небольшом клиническом материале (биопсия + операционный материал после НАХТ) отмечали, что экспрессия генов *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCC3* после химиотерапии по схеме FEC не выше уровня до

лечения. Эти же авторы по гену *ABCG2* показали разнонаправленное изменение среднего уровня экспрессии гена *ABCG2* в опухоли после НАХТ по сравнению с уровнем до НАХТ у отвечающих (некоторое снижение) и неответающих (повышение) пациентов [Faneyte I.F., et al., 2002, Faneyte I.F., et al., 2004]. Sabine Linn et al (1997) продемонстрировала повышение и снижение числа клеток, экспрессирующих белки *ABCB1*, *ABCC1* и *MVP* в опухоли молочной железы после НАХТ. Однако эти авторы не сопоставляли индивидуальные изменения экспрессии белков с ответом на НАХТ [Linn S.C., et al., 1997]. Vaclavikova et al (2008) и Hlavac et al (2013) показали, что экспрессия *ABCB1* в опухоли после НАХТ ниже, чем в прилегающей нормальной ткани молочной железы [Hlavac V., et al., 2013, Vaclavikova R., et al., 2008]. В работе Kim B. и соавт. [Kim B., et al., 2013], опубликованной на полгода позже нашей статьи, было показано снижение ИГХ экспрессии Р-гликопротеина и белка *ABCG2* в опухолях молочной железы после НАХТ, по сравнению с уровнем экспрессии до лечения, в 26 и 41% случаев соответственно. Корреляции изменения экспрессии белков АВС-транспортеров с эффектом НАХТ не наблюдалось. Авторы статьи не обсуждают возможные механизмы снижения экспрессии белков АВС.

В опытах *in vitro* на опухолевых линиях не было установлено снижения экспрессии генов МЛУ в ответ на воздействие химиопрепаратов, хотя проводилось множество исследований по изучению механизмов регуляции экспрессии генов АВС. По-видимому, в клинической ситуации, в отличие от экспериментов *in vitro* на клеточных линиях, происходит активный процесс становления МЛУ при лечении, на который оказывают влияние факторы организма, опухоли и микроокружения. Изучение процесса формирования МЛУ, а не просто уровня экспрессии АВС-транспортеров до лечения, даст возможность понять механизмы химиорезистентности опухолей.

Таким образом, анализ мировой литературы показал, что существуют множество данных по повышению экспрессии генов и белков АВС-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ и одно клиническое исследование, которое подтвердило наши приоритетные данные о снижении экспрессии генов АВС в процессе предоперационной химиотерапии. Нами впервые установлен факт связи с эффективностью НАХТ не уровня, а изменения экспрессии генов АВС: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *MVP*, *ABCG1* и *ABCG2* в опухоли в процессе лечения, т.е. с процессом формирования адаптивной МЛУ. Повышение экспрессии АВС-транспортеров в опухоли в процессе химиотерапии обуславливает отсутствие ответа на химиотерапию, а снижение экспрессии АВС-транспортеров – хороший ответ на НАХТ. Как полагает профессор М. Tien Kuo, будущие работы должны сосредоточиться на молекулярном исследовании того,

как регулируется экспрессия генов МЛУ в нормальных и опухолевых клетках молочной железы [Кюо М.Т., 2007]. Наши данные впервые обосновывают новую стратегию управления множественной лекарственной устойчивостью через регулирование экспрессии АВС-транспортеров (а не через подавление активности белков АВС, как это было ранее [Tamaki A., et al., 2011]).

3.3 Значимость экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в отношении безметастатической выживаемости пациентов

Согласно мировой литературе, связь исходного уровня экспрессии генов ABC-транспортеров с показателями выживаемости неоднозначна. По данным ряда авторов экспрессия генов ABC-транспортеров не ассоциирована с общей и безметастатической выживаемостью при раке молочной железы [Kanzaki A., et al., 2001, Larkin A., et al., 2004, Moureau-Zabotto L., et al., 2006, Nooter K., et al., 1997]. Результаты других исследователей, напротив, показали выраженную связь повышенной экспрессии ABC-транспортеров с плохой выживаемостью и высокой частотой метастазирования больных РМЖ [Burger H., et al., 2003, Filipits M., et al., 2005, Maciejczyk A., et al., 2012, Surowiak P., et al., 2005].

Таким образом, в клинических исследованиях не получено убедительных доказательств того, что высокий уровень экспрессии ABC-транспортеров и их продуктов в опухолевых клетках обеспечивает и устойчивость к химиопрепаратам и является неблагоприятным прогностическим фактором.

В предыдущем параграфе были получены оригинальные данные, свидетельствующие о том, что непосредственная эффективность НАХТ ассоциирована не с исходным уровнем экспрессии ABC-транспортеров в опухоли, а с изменениями экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении химиотерапии. У больных, для которых зарегистрировано снижение экспрессии после НАХТ, по сравнению с исходным уровнем, отмечен объективный ответ на лечение, тогда как повышение экспрессии ABC-транспортеров в процессе химиотерапии в подавляющем большинстве случаев было связано с отсутствием непосредственного клинического ответа. В этой связи было выдвинуто предположение о том, что с прогнозом заболевания также связан не собственно уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли, а изменения их экспрессии в процессе химиотерапии.

В настоящем параграфе работы рассматривается связь изменения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ с безметастатической выживаемостью.

Из 120 обследованных пациентов гематогенные метастазы развились у 37 (30,8%) больных в диапазоне 1-48 месяцев от даты постановки диагноза (рисунок 13А). Трехлетняя безметастатическая выживаемость пациентов составила 73%, а пятилетняя безметастатическая выживаемость – 67%. Рецидивы в область послеоперационного рубца наблюдались у 10 (8,3%) пациентов, при этом у 8/10 (80%) пациентов с рецидивами были отмечены отдаленные метастазы. За период динамического наблюдения (80 месяцев) 32

(26,7%) больных умерло, из них 27 (22,5%) – от прогрессирования основного заболевания. Трехлетняя общая выживаемость пациентов составила 85%, 5-ти выживаемость – 70% (рисунок 13Б).

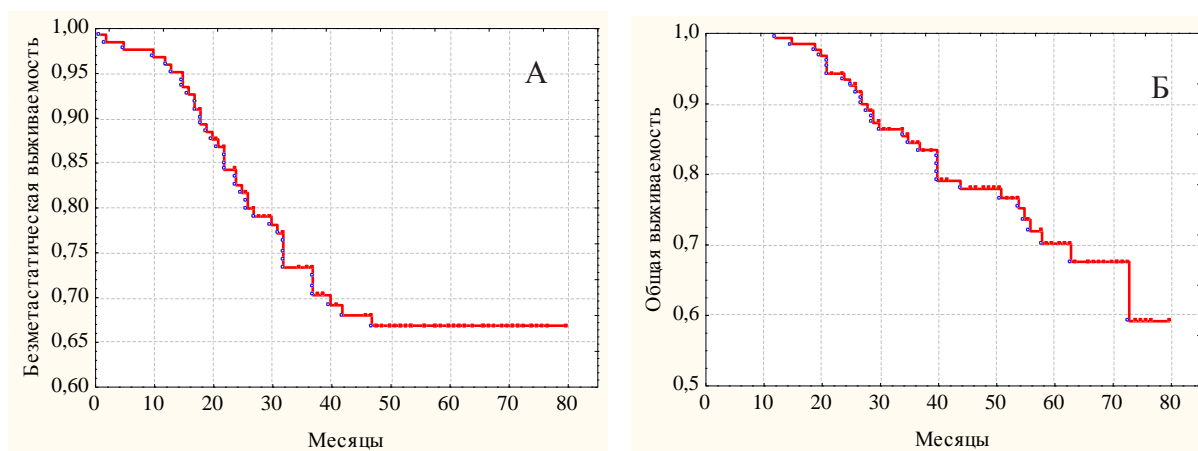


Рисунок 13. – Безметастатическая (А) и общая (Б) выживаемость исследуемой группы больных РМЖ (n=120) по методу Каплана-Майера.

В таблице 13 представлены данные пятилетней безметастатической выживаемости и частота гематогенных метастазов у больных РМЖ, в зависимости от клинико-патологических характеристик опухолевого процесса.

Безметастатическая выживаемость зависела от лимфогенного метастазирования, размера опухоли, ее гистологической формы, молекулярного подтипа, степени лекарственного патоморфоза после НАХТ. Возраст, рецепторный статус, схема НАХТ, эффект и количество курсов НАХТ не влияли на безметастатическую выживаемость. В целом, прогностическая значимость основных клинико-патологических параметров соответствует литературным данным, и самыми «сильными» прогностическими факторами явились лимфогенное метастазирование и размер опухоли [Clark G.M., 1995, Perel'muter V.M., et al., 2008, Wolmark N., et al., 2001, Семиглазов В.Ф., и др., 2009].

Для того, чтобы оценить, связана ли фоновая (начальная, предсуществующая) экспрессия генов ABC-транспортеров с прогнозом, была изучена пятилетняя безметастатическая выживаемость в зависимости от уровня экспрессии генов ABC в опухоли молочной железы до лечения (таблица 14). В качестве порогового уровня, разделяющего больных на группы с высоким и низким уровнями экспрессии гена было выбрано среднее значение экспрессии данного гена по всем исследованным больным. Если экспрессия превышала средний уровень, то таких больных относили в группу с высоким уровнем экспрессии, если экспрессия была ниже среднего уровня, то больного относили в группу с низким уровнем экспрессии.

Таблица 13. – Пятилетняя безметастатическая выживаемость в зависимости от основных клинико-патологических параметров и эффекта НАХТ у больных раком молочной железы

Клинико-патологические параметры	Пятилетняя безметастатическая выживаемость	p-value	Количество больных с метастазами в группе, n/N (%/%)	p-value
T ₁₋₂ T ₃₋₄	70% 37%	0,017	29/77 (27/73) 8/6 (57/43)	0,032
N ₀ N ₁₋₃	91% 50%	0,00001	4/42 (9/91) 33/31 (52/48)	0,000004
≤45 лет >45 лет	63% 69%	0,488	16/29 (36/64) 21/54 (28/72)	0,419
Уницентрический Мультицентрический	75% 48%	0,001	20/65 (24/76) 17/18 (49/51)	0,009
ER+ ER-	72% 60%	0,108	16/45 (26/74) 19/33 (37/63)	0,308
PR+ PR-	65% 69%	0,647	20/40 (33/67) 15/38 (28/72)	0,684
HER2 (- или +) HER2 (++) или(+++)	70% 62%	0,437	23/60 (28/72) 11/18 (38/62)	0,351
1. Люминальный В 2. Трижды негативный 3. HER2 позитивный	74% 69% 44%	1-2=0,744 2-3=0,111 1-3=0,018	18/54 (25/75) 8/22 (27/73) 9/7 (56/44)	1-2=1,0 2-3=0,061 1-3=0,019
Полная+частичная регрессия Стабилизация+прогрессия	71% 60%	0,211	19/53 (26/74) 18/30 (38/62)	0,229
Патоморфоз 1-2 степени Патоморфоз 3-4 степени	53% 83%	0,013	29/38 (43/57) 4/21 (16/84)	0,027
САХ+FAC Таксотер	66% 72%	0,954	30/65 (32/68) 7/18 (28/72)	0,812
Больше 2 курсов НАХТ 2 курса НАХТ	68% 63%	0,725	26/61 (30/70) 11/22 (33/67)	0,825

Примечание: p-value – уровень статистической значимости различий между группами. Для пятилетней выживаемости р вычислялся по log-rank тесту для кривых выживаемости, для сравнения количества больных с метастазами между группами в зависимости от клинико-патологических параметров использовался двусторонний критерий Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>); полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия; n – количество больных с метастазами в группе; N – количество больных без метастазов в группе.

Согласно полученным результатам, из числа всех исследованных генов только уровень экспрессии гена *ABCB3* в опухоли до лечения был связан с безметастатической выживаемостью. У больных с высоким уровнем экспрессии *ABCB3* пятилетняя безметастатическая выживаемость была выше, чем у больных с низкой экспрессией, а частота больных с метастазами была ниже (таблица 14). Использование других способов дискриминации групп с низким и высоким уровнем экспрессии (верхний и нижний квартили, менее 30 и более 70% уровень и др.) не выявило статистически значимых

различий между группами по показателям безметастатической выживаемости ни по одному гену (данные не представлены).

Таблица 14. – Пятилетняя безметастатическая выживаемость в зависимости от уровня экспрессии генов МЛУ в опухоли молочной железы до лечения

Экспрессия генов	Пятилетняя безметастатическая выживаемость	p-value	Количество больных с метастазами в группе, n/N (%/%)	p-value
<i>ABCB1</i> высокий уровень	67%	0,716	10/22 (27/27)	1,0
<i>ABCB1</i> низкий уровень	67%		27/61 (73/73)	
<i>ABCB3</i> высокий уровень	84%	0,002	6/37 (17/45)	0,006
<i>ABCB3</i> низкий уровень	58%		29/45 (83/55)	
<i>ABCC1</i> высокий уровень	66%	0,878	14/30 (38/36)	1,0
<i>ABCC1</i> низкий уровень	68%		23/53 (62/64)	
<i>ABCC2</i> высокий уровень	64%	0,601	14/27 (38/33)	0,677
<i>ABCC2</i> низкий уровень	68%		23/56 (62/67)	
<i>ABCC5</i> высокий уровень	69%	0,703	9/22 (26/27)	1,0
<i>ABCC5</i> низкий уровень	66%		26/60 (74/73)	
<i>ABCG1</i> высокий уровень	77%	0,167	7/21 (19/26)	0,489
<i>ABCG1</i> низкий уровень	64%		30/60 (81/74)	
<i>ABCG2</i> высокий уровень	61%	0,422	15/27 (41/33)	0,414
<i>ABCG2</i> низкий уровень	69%		22/56 (59/67)	
<i>MVP</i> высокий уровень	63%	0,809	9/18 (27/22)	0,811
<i>MVP</i> низкий уровень	69%		26/64 (73/78)	

Примечание: p-value – уровень статистической значимости различий между группами. Для пятилетней выживаемости p вычислялся по log-rank тесту для кривых выживаемости, для сравнения количества больных с метастазами между группами в зависимости от уровня экспрессии ABC-транспортеров использовался двусторонний критерий Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>); полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия; n – количество больных с метастазами в группе; N – количество больных без метастазов в группе.

Как уже говорилось выше, ген *ABCB3* экспрессируется во всех клетках и играет важную роль в транспортировке эндогенных пептидов из цитоплазмы в эндоплазматический ретикулум, где они объединяются вместе с молекулами главного комплекса гистосовместимости 1 класса (МНС I) для представления антигенов (<http://omim.org/entry/1702600>). Молекулы МНС I представляют внутриклеточные пептиды (в том числе и вирусные) цитотоксическим Т-лимфоцитам и репрессия *ABCB3* является механизмом, который позволяет вирусам при заражении клеток избегать иммунного ответа [Ghanem E., et al., 2010, Loch S., et al., 2005]. Описан иммунодефицитный синдром BLS (Bare Lymphocyte Syndrome), обусловленный наследственной мутацией в гене *ABCB3*, в результате которой отсутствует экспрессия белка TAP2 и МНС I на поверхности клеток. Синдром проявляется гранулематозными поражениями кожи и рецидивными бактериальными инфекциями, существенными

нарушениями функции CD8+ Т-лимфоцитов [Moitra K., 2012]. Наши исследования показали, что уровень экспрессии гена *ABCB3* до лечения коррелирует с эффектом НАХТ. У больных с полной и частичной регрессией исходный уровень экспрессии в 1,8 раза выше, чем у больных со стабилизацией и прогрессированием ($1,10 \pm 0,12$ против $0,62 \pm 0,09$, $p = 0,003$ соответственно). Можно предположить, что высокий уровень экспрессии гена *ABCB3* обуславливает усиление CD8+ Т-лимфоцитарного иммунного ответа в опухоли молочной железы, благодаря чему и увеличивается эффективность НАХТ и безметастатическая выживаемость.

Таким образом, среди 8-ми изученных ABC-транспортеров только уровень *ABCB3* до лечения связан с безметастатической выживаемостью, что может быть обусловлено другим механизмом его действия, не связанным с выбросом препаратов из клетки. Исходный уровень экспрессии основных ABC-транспортеров, которые определяют множественную лекарственную устойчивость опухоли молочной железы, не показал связи с безметастатической выживаемостью. Это подтверждает противоречивость данных о прогностической значимости исходного уровня экспрессии ABC-транспортеров до лечения (см. лит. обзор).

Ранее было выдвинуто предположение о том, что прогностическую значимость может иметь не уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли до лечения, а изменение экспрессии (повышение или снижение) при проведении химиотерапии. Это предположение основано на том, что была выявлена связь направления изменения опухолевой экспрессии ABC-транспортеров с эффектом НАХТ. Мы оценили безметастатическую выживаемость в зависимости от повышения или снижения экспрессии генов ABC, детектированных при проведении НАХТ. В это исследование включены 106 из 120 больных, т.к. для 14 больных, у которых в процессе НАХТ была достигнута полная морфологическая регрессия, не представлялось возможным оценить уровень экспрессии генов МЛУ в опухоли и соответственно, определить вектор его изменения. Кроме того, уже хорошо известно, что достижение полной морфологической регрессии при проведении НАХТ является благоприятным прогностическим фактором и ключевым маркером эффективности адъювантной химиотерапии и повышения выживаемости пациентов [Caudle A.S., et al., 2010, Gralow J.R., et al., 2008, Kaufmann M., et al., 2003, Wolmark N., et al., 2001].

В таблице 15 представлена пятилетняя безметастатическая выживаемость и частота отдаленного метастазирования в группах со снижением и повышением экспрессии генов МЛУ в опухоли при проведении НАХТ. По трем генам (*ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1*) был достигнут статистически значимый уровень p в log-rank тесте (0,006-0,03) для пятилетней

выживаемости и по двухстороннему критерию Фишера (0,014-0,039) для частоты метастазирования в группах. Кривые безметастатической выживаемости в зависимости от изменения экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* представлены на рисунке 14. Показатели безметастатической выживаемости существенно выше у больных со снижением экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в опухоли по сравнению с пациентами, для которых показано повышение их экспрессии после НАХТ (73-78% против 50-55%).

Таблица 15. – Пятилетняя безметастатическая выживаемость в зависимости от направления изменения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли при проведении НАХТ

Экспрессия генов	Пятилетняя безметастатическая выживаемость	p-value	Количество больных с метастазами в группе, n/N (%/%)	p-value
<i>ABCB1</i> снижение	78%	0,006	12/43 (34/61)	0,014
<i>ABCB1</i> повышение	51%		23/28 (66/39)	
<i>ABCB3</i> снижение	69%	0,317	20/47 (61/67)	0,658
<i>ABCB3</i> повышение	59%		13/23 (39/33)	
<i>ABCC1</i> снижение	71%	0,159	15/40 (43/56)	0,219
<i>ABCC1</i> повышение	59%		20/31 (57/44)	
<i>ABCC2</i> снижение	73%	0,032	14/43 (39/61)	0,039
<i>ABCC2</i> повышение	55%		22/27 (61/39)	
<i>ABCC5</i> снижение	71%	0,201	14/39 (42/56)	0,291
<i>ABCC5</i> повышение	60%		19/31 (58/44)	
<i>ABCG1</i> снижение	75%	0,009	15/49 (44/70)	0,019
<i>ABCG1</i> повышение	50%		19/21 (56/30)	
<i>ABCG2</i> снижение	68%	0,561	18/40 (51/56)	0,681
<i>ABCG2</i> повышение	61%		17/31 (49/44)	
<i>MVP</i> снижение	67%	0,879	19/44 (58/63)	0,667
<i>MVP</i> повышение	63%		14/26 (42/47)	

Примечание: см. табл. 14

Таким образом, изменение экспрессии генов ABC-транспортеров при воздействии химиопрепаратов, в отличие от исходного уровня экспрессии, имеет прогностическую значимость. Повышение опухолевой экспрессии *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в процессе НАХТ является неблагоприятным прогностическим признаком, а снижение экспрессии этих генов – благоприятным прогностическим фактором.

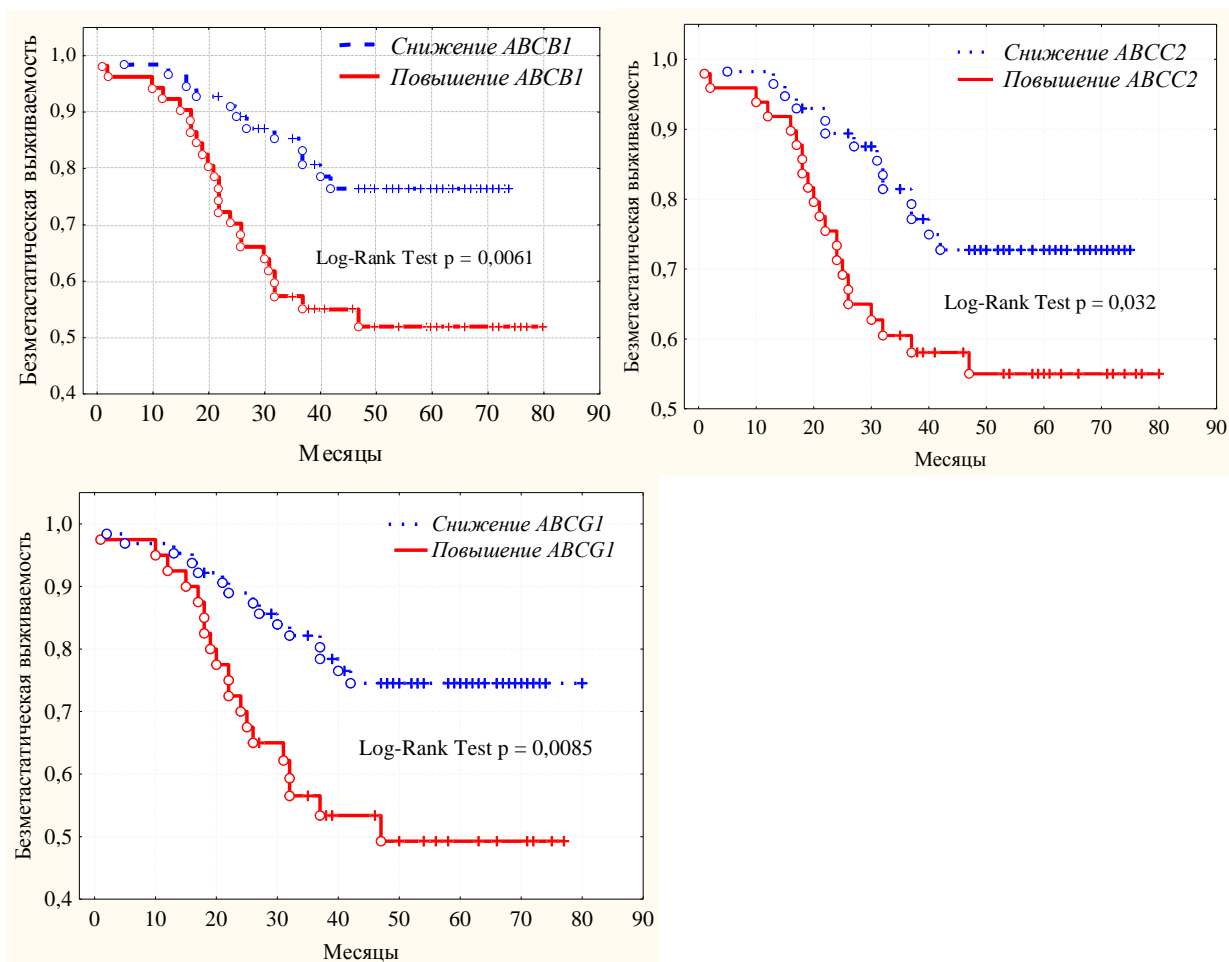


Рисунок 14. – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от изменения опухолевой экспрессии ABC-транспортеров при проведении НАХТ.

Возникает закономерный вопрос, связано ли изменение экспрессии ABC-транспортеров, как потенциальный прогностический фактор, со стандартными факторами прогноза. Для ответа на этот вопрос было проведено сопоставление групп пациентов со снижением (\downarrow) и повышением (\uparrow) экспрессии генов МЛЮ по основным клинико-патологическим характеристикам, которые могут вносить вклад в клиническое течение заболевания (таблица 16). Оказалось, что группы со снижением и повышением экспрессии трех генов МЛЮ (*ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1*) не различаются между собой по возрасту пациенток, их менструальному статусу, а также размеру опухоли, частоте лимфогенного метастазирования, рецепторному статусу опухоли (ER, PR и HER2), по частотам молекулярных подтипов, гистологической форме и схеме НАХТ (таблица 16). Следует лишь отметить тенденцию к увеличению частоты больных с мультицентрическим РМЖ в группах с повышением экспрессии генов *ABCB1* и *ABCC2*, но в группе с повышением экспрессии *ABCG1* нет даже тенденции. Результат анализа таблицы 16 позволяет сделать достаточно обоснованный вывод о том, что направление изменения опухолевой

экспрессии генов МЛЮ при проведении НАХТ является независимым прогностическим фактором.

Ранее мы уже высказывали предположение о том, что изменение (повышение или снижение) экспрессии ABC-транспортёров в ответ на воздействие химиопрепаратов – является отражением индивидуального паттерна регуляции генов МЛЮ, свойственного конкретному пациенту и его опухоли.

Таблица 16 – Клинико-патологические параметры в группах больных РМЖ со снижением (↓) и повышением (↑) экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ

Клинико-патологические параметры	ABCBI		p-value	ABCC2		p-value	ABCG1		p-value
	↓	↑		↓	↑		↓	↑	
≤45 лет	19	17	0,839	21	15	0,538	23	11	0,393
>45 лет	35	35		35	35		40	30	
Пременопауза	32	30	1,0	32	30	0,844	38	22	0,546
Постменопауза	22	22		24	20		25	19	
T ₁₋₂	48	44	0,576	51	41	0,251	55	35	1,0
T ₃₋₄	6	8		5	9		8	6	
N ₀	21	18	0,691	20	19	0,842	23	15	1,0
N ₁₋₃	33	34		36	31		40	26	
ER+	25	29	0,324	29	25	1,0	31	22	0,836
ER-	26	20		24	22		28	17	
PR+	27	29	0,552	30	26	1,0	31	23	0,543
PR-	24	20		23	21		28	16	
HER2 (- или +)	31	40	0,124	38	33	0,665	39	31	0,249
HER2 (++ или+++)	18	11		14	15		19	8	
Люминальный В	32	32	0,881	37	27	0,151	39	24	0,963
Трижды негативный	13	11		14	10		13	11	
HER2 позитивный	9	7		5	11		10	5	
Уницентрический	44	28	0,063	43	29	0,096	44	26	0,527
Мультицентрический	14	20		14	20		19	15	
САХ+FAC	41	40	1,0	40	41	0,254	48	32	1,0
Таксотер	13	12		16	9		15	9	

Примечание: С – снижение опухолевой экспрессии гена при проведении НАХТ; П – повышение опухолевой экспрессии гена при проведении НАХТ; p-value – уровень статистической значимости различий по двустороннему критерию Фишера.

Этот паттерн может определяться, прежде всего, генетическими механизмами регуляции экспрессии, такими как полиморфизм генов ABC-транспортёров [Chang H., et al., 2009], метилирование ДНК, деацетилирование гистонов, факторы транскрипции, мутации и микроРНК, которые могут быть вовлечены в модуляцию экспрессии генов МЛЮ или модуляцию процессов сплайсинга и трансляции [Glubb D.M., et al., 2011, Reed K., et al., 2010, Sharma G., et al., 2010], и/или особенности строения опухоли, связанные с

внутриопухолевой морфологической гетерогенностью [Zavyalova M., et al., 2011, Завьялова М.В., и др., 2008], или же определяться хромосомными aberrациями, которые мы изучили в следующих разделах. Трудно объяснить, каким образом изменение экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ связано с гематогенным метастазированием. Возможно, стойкое повышение экспрессии ABC-транспортёров в остаточной после НАХТ опухоли является всего лишь маркером такого же стойкого повышения экспрессии генов ABC в клетках микрометастазов, в результате чего последние оказываются малочувствительными к адъювантной химиотерапии, призванной подавлять очаги микрометастазирования [Загрекова Е.И., и др., 2002]. Теоретически, это может также обеспечить ранний контроль микрометастатической болезни [Caudle A.S., et al., 2010, Precht L.M., et al., 2010].

Таким образом, в результате исследования был установлен новый информативный прогностический фактор – изменение экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы, который может быть определен при проведении НАХТ. Повышение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в процессе химиотерапии является неблагоприятным прогностическим признаком, а снижение экспрессии этих генов – благоприятным прогностическим признаком. Новый потенциальный прогностический фактор не зависит от стандартных клинико-патологических факторов прогноза (лимфогенного метастазирования, размера опухоли молочной железы, рецепторного статуса, молекулярных подтипов, гистологической формы роста опухоли и др.) и может существенно повысить эффективность прогнозирования исхода РМЖ.

В параграфе 3.2 было продемонстрировано, что в клинической ситуации эффективность НАХТ рака молочной железы связана с изменением экспрессии ABC-транспортёров в опухоли в процессе НАХТ, а не с исходным уровнем экспрессии генов ABC до лечения. Уменьшение экспрессии пяти основных ATP-Binding Cassette – *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* в опухоли молочной железы после проведения НАХТ по сравнению с биопсийными образцами до лечения сочеталось с объективным ответом на НАХТ. Повышение экспрессии этих генов было связано с отсутствием непосредственного эффекта НАХТ. У большинства пациентов наблюдается однонаправленное изменение экспрессии пяти основных ABC-транспортёров в процессе НАХТ в строгом соответствии с ее эффектом, т.е. снижение при хорошем ответе на НАХТ и повышение при его отсутствии. Это явление было названо нами градиентным феноменом. У четверти пациентов не наблюдалось однонаправленного изменения экспрессии ABC-транспортёров (оно было разнонаправленным) в соответствии с эффектом НАХТ – градиентный феномен отсутствовал. Поскольку мы показали, что снижение экспрессии генов МЛУ при

проведении НАХТ является благоприятным прогностическим фактором, а повышение экспрессии – неблагоприятным фактором. В этой связи правомочен вопрос, как градиентный феномен связан с прогрессией РМЖ.

В данном разделе проведено исследование связи наличия/отсутствия градиентного феномена, который наблюдается у больных раком молочной железы при проведении неoadьювантной химиотерапии, с безметастатической выживаемостью. Проводилось сравнение уровня экспрессии генов *ABCBI*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* до лечения и после НАХТ, и определялось направление изменения их экспрессии. Отмечалось повышение опухолевой экспрессии генов МЛУ в процессе НАХТ (уровень до лечения был меньше, чем после НАХТ), или снижение экспрессии генов АВС. Если направление экспрессии всех 5-ти или 4-х генов совпадало с эффектом НАХТ (при повышении экспрессии – отсутствие клинического эффекта НАХТ, при снижении экспрессии – частичная регрессия), то у больного констатировали наличие градиентного феномена. Таким образом, градиентный феномен можно определить как однонаправленное изменение опухолевой экспрессии генов *ABCBI*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* в процессе НАХТ в строгом соответствии с эффектом химиотерапии. Градиентный феномен наблюдался у 80 (75%) из 106 обследованных больных. Если изменение экспрессии генов МЛУ в процессе НАХТ было разнонаправленным и изменение хотя бы 2-х и более из 5-ти генов не соответствовало эффекту НАХТ, у таких пациентов констатировали отсутствие градиентного феномена. Градиентный феномен отсутствовал у 26 (25%) больных. В этой связи, все обследованные были поделены на 2 группы: 1 группа – с наличием градиентного феномена (80 пациентов) и 2 группа – с отсутствием градиентного феномена (26 больных). На первом этапе исследований было показано, что группы больных с наличием и отсутствием градиентного феномена не отличались друг от друга по основным клинико-патологическим параметрам (таблица 17). Можно отметить только тенденцию к увеличению частоты встречаемости отрицательного рецепторного статуса (ER- и PR-) в группе больных без градиентного феномена. Также исследуемые группы не различались между собой по среднему уровню экспрессии генов *ABCBI*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* в биопсийном образце опухоли до лечения и операционном материале после НАХТ (данные не представлены). Это дает основания полагать, что наличие/отсутствие градиентного феномена не определяется основными клинико-патологическими параметрами, в том числе и молекулярными подтипами РМЖ и позволяет корректно провести сравнение показателей безметастатической выживаемости в исследуемых группах. На следующем этапе была изучена связь градиентного феномена с показателями безметастатической выживаемости. В общей группе из 106 обследованных

пациентов отдаленные метастазы развились у 35 (33%) больных в сроки 3-48 месяцев от даты постановки диагноза. Трехлетняя безметастатическая выживаемость пациентов составила 72%, а пятилетняя – 65%.

Таблица 17 – Клинико-патологические параметры в группах больных РМЖ с наличием и отсутствием градиентного феномена.

Клинико-патологические параметры	Градиентный феномен		p-value
	Есть, n (%)	Нет, n (%)	
≤45 лет	26 (33)	10 (38)	0,637
>45 лет	54 (67)	16 (62)	
Пременопауза	45 (56)	17 (65)	0,495
Постменопауза	35 (44)	9 (35)	
T ₁₋₂	71 (89)	21 (81)	0,324
T ₃₋₄	9 (11)	5 (19)	
N ₀	32 (40)	7 (27)	0,253
N ₁₋₃	48 (60)	19 (73)	
1 степень злокачественности	3 (5)	1 (4)	0,455
2 степень злокачественности	55 (87)	19 (79)	
3 степень злокачественности	5 (8)	4 (17)	
ER+	44 (59)	10 (40)	0,164
ER-	31 (41)	15 (60)	
PR+	46 (61)	10 (40)	0,102
PR-	29 (39)	15 (60)	
HER2 (0 или +)	53 (71)	18 (72)	1,0
HER2 (++) или (+++)	21 (29)	7 (28)	
Люминальный	52 (66)	11 (44)	0,129
Трижды негативный	15 (19)	9 (36)	
HER2 позитивный	12 (15)	5 (20)	
Уницентрический	57 (71)	15 (58)	0,230
Мультицентрический	23 (29)	11 (42)	
САХ+FAC	60 (75)	22 (85)	0,422
Таксотер	20 (25)	4 (15)	
Частичная регрессия	45 (56)	13 (50)	0,653
Стабилизация+Прогрессирование	35 (44)	13 (50)	

Примечание: p-value – уровень статистической значимости различий по двустороннему критерию Фишера.

На рисунке 15А представлены кривые безметастатической выживаемости у больных с наличием и отсутствием градиентного феномена. При наличии градиентного феномена пятилетняя безметастатическая выживаемость составила 73% против 39% у больных без градиентного феномена (log-rank test p=0,0018). Частота метастазирования составила: 25% и 58% соответственно (p = 0,0021 по критерию Фишера). Это позволяет рассматривать наличие градиентного феномена у пациентов в качестве благоприятного прогностического фактора. При отсутствии градиентного феномена относительный риск развития гематогенных метастазов составляет RR = 1,77(95% CI 1,11-2,83),(p = 0,005).

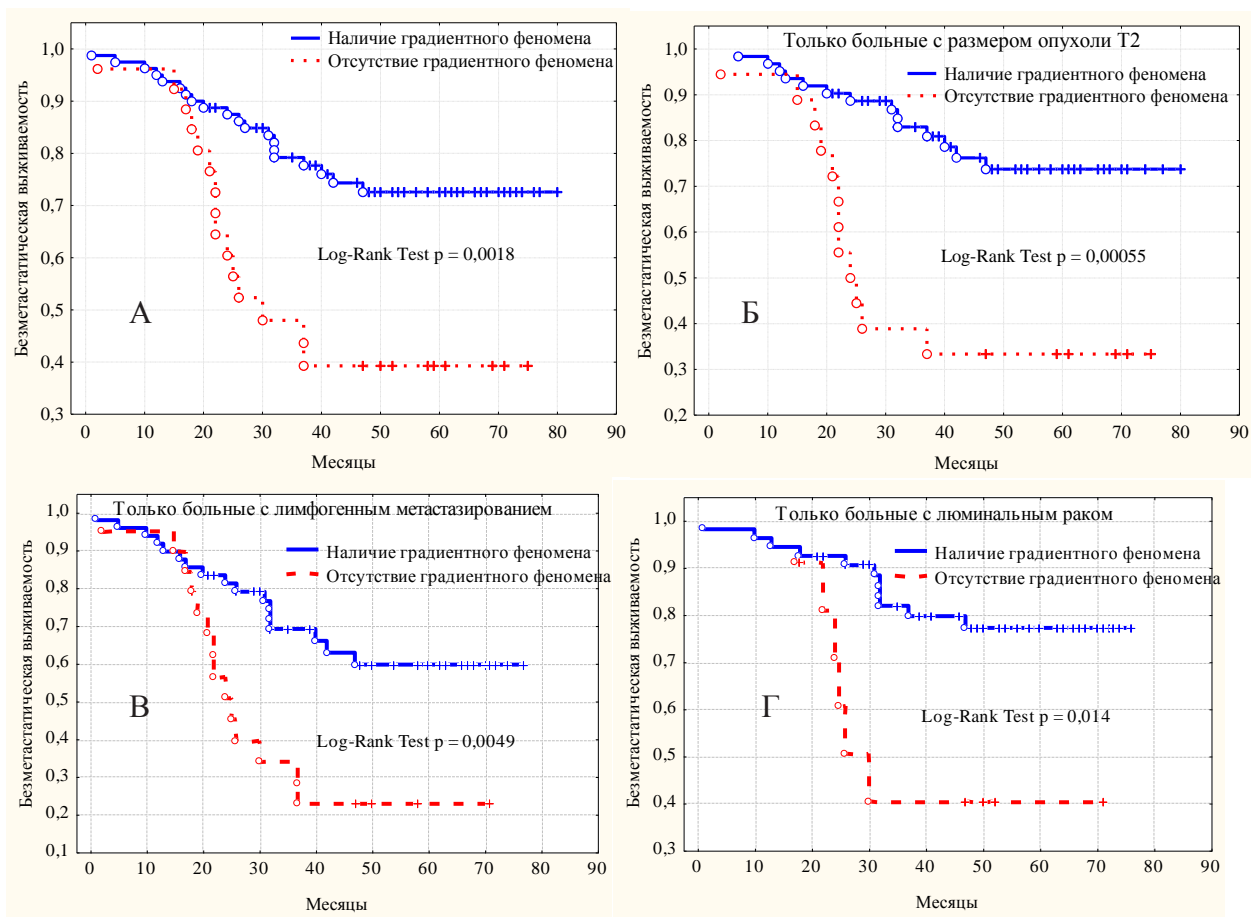


Рисунок 15 – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия градиентного феномена. А – общая группа, Б – только больные с размером опухоли T₂, В – Только больные с лимфогенным метастазированием, Г – только больные с люминальным раком.

Статистический анализ: p-value – вычислялся по log-rank тесту;

Градиентный феномен является независимым прогностическим фактором, который успешно работает и позволяет дифференцировать больных по исходу в таких «однородных» группах как пациенты с T₂ размером опухоли (рисунок 15Б) (RR = 2,32(95% CI 1,19-4,52), p = 0,001), пациенты с лимфогенным метастазированием (рисунок 15В) (RR = 2,45(95% CI 1,12-5,36), p = 0,01) и больные с люминальным раком (рисунок 15Г) (RR = 1,74(95% CI 0,90-3,38), p = 0,03). Таким образом, градиентный феномен имеет высокозначимую связь с развитием метастатической болезни при раке молочной железы.

Можно предположить, что градиентный феномен, наблюдаемый у больных РМЖ при проведении НАХТ, является маркером (также как и повышение экспрессии ABC-транспортеров в опухоли при проведении НАХТ является маркером процесса формирования МЛУ), показывающим наличие в опухолевых клетках сбалансированной системы генной регуляции, поэтому не случайна однонаправленность изменений экспрессии изученных генов МЛУ в опухоли при лечении в строгом соответствии с

эффектом НАХТ, характерная для градиентного феномена. Учитывая, что все изученные ABC-транспортеры локализованы в разных хромосомах (*ABCB1* – 7q21.12; *ABCC1* – 16p13.11; *ABCC2* – 10q24.2; *ABCG1* – 21q22.3; *ABCG2* – 4q22.1 <http://www.genecards.org/>), они не являются сцепленными. Мы полагаем, что он показывает сохранность в опухолевых клетках баланса многих систем жизнеобеспечения, реактивности и гибели.

Отсутствие градиентного феномена является маркером серьезных нарушений в реакции клеток и в системе генной регуляции (дизрегуляция и дисбаланс) опухолевых клеток, показывая их высокий агрессивный потенциал. В отсутствие градиентного феномена при НАХТ могут играть роль такие нарушения процесса апоптоза, индуцируемого лекарственными средствами, как неадекватность ответа на химиопрепараты вплоть до стимуляции пролиферации вместо апоптоза. Возможны нарушения в трансдукции сигнала вплоть до реверсии реактивности клеточных рецепторов: адгезии (кадхеринов, интегринов, катенинов), рецепторов факторов роста, frizzled рецепторов и др. [Gillet J.P., et al., 2012]. Высокая внутриопухолевая гетерогенность, свойственная РМЖ, с большим числом клонов, несущих разные первичные и вторичные драйверные мутации и мутации «пассажиры» [Bhatia S., et al., 2012], может вносить вклад в формирование градиентного феномена. Например, драйверные мутации гена-супрессора опухолевого роста *TP53* могут приводить к инактивации или парадоксальной реализации (активации вместо ингибирования и наоборот) многих клеточных функций, таких как апоптоз, репарация, регуляции экспрессии множества генов, в том числе и генов ABC [Cherdyntseva N., et al., 2010, Johnson R.A., et al., 2001, Litviakov N.V., et al., 2010, Sampath J., et al., 2001, Чумаков П., 2007]. При этом интересно, что частота мутаций *TP53* при РМЖ составляет 25% [Olivier M., et al., 2010], и это совпадает с частотой отсутствия у больных градиентного феномена (25%). Механизмы, которые определяют наличие/отсутствие градиентного феномена, его значение для клеточной регуляции, требуют дальнейшего тщательного исследования, актуальность которого обусловлена прогностической значимостью этого феномена.

Заключение к 3 главе

Исследование связи экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы с основными клинико-морфологическими параметрами показало, что связь экспрессии генов ABC с клиническими параметрами носит редкий и случайный характер, и такие ассоциации, обусловлены большим количеством сравниваемых параметров. Из всех клинических параметров рака молочной железы значимая связь экспрессии 6 из 8 ABC-транспортеров в опухоли молочной железы после НАХТ установлена с размером первичной опухоли. Далее была изучено значение экспрессии ABC-транспортеров в реализации непосредственного эффекта химиотерапии и безметастатической выживаемости пациентов.

Средние уровни экспрессии практически всех изученных генов до лечения не различались у пациентов с объективным клиническим ответом на НАХТ и отсутствием ответа, т.е. предсуществующая МЛУ не играет существенной роли в реализации эффекта НАХТ. Это хорошо согласуется с данными клинических исследований многих авторов, которые также не могли установить ясной связи начального уровня экспрессии белков и генов ABC-транспортеров и эффекта неoadъювантной химиотерапии. Из всех ABC-транспортеров, только уровень экспрессии гена *ABCB3* в опухоли до лечения различался у больных с объективным ответом и отсутствием ответа на НАХТ и был статистически значимо выше у больных с объективным клиническим ответом.

Уровень экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1* и *ABCG2* в опухоли после проведения НАХТ статистически значимо различался в группах с объективным ответом и отсутствием ответа на лечение. В группе с объективным ответом экспрессия данных генов значительно выше, чем у больных со стабилизацией или прогрессированием. Эти данные показали, что изначально, у больных с объективным ответом и отсутствием ответа экспрессия ABC-транспортеров до лечения не различается, но после проведения НАХТ группы расходятся по уровню экспрессии генов в операционном материале опухоли после НАХТ. У ответивших пациентов экспрессия низкая, а у не ответивших больных – экспрессия высокая. По сути, нами впервые было показано, что происходит разнонаправленное изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. У больных с объективным ответом на НАХТ наблюдается снижение экспрессии генов ABC-транспортеров, а у больных с отсутствием ответа происходит повышение экспрессии генов ABC. Эффект химиотерапии связан не с уровнем экспрессии гена ABC, а с изменением их экспрессии в опухолевой ткани в процессе лечения. Это подтверждает и анализ связи частоты снижения и повышения

экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХ с эффектом химиотерапии. У пациенток с объективным клиническим ответом в опухоли наблюдается снижение экспрессии генов МЛУ в опухоли в 61-84% случаев, а у пациенток с отсутствием ответа в процессе проведения химиотерапии наблюдается повышение уровня экспрессии этих генов в опухоли в 63-88 % случаев ($0,02 < p < 1,1 \times 10^{-12}$).

Таким образом, нами был впервые установлен и подтвержден несколькими видами анализов факт связи с эффективностью НАХТ не уровня, а изменения экспрессии генов ABC: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *MVP*, *ABCG1* и *ABCG2* в опухоли в процессе лечения. Повышение экспрессии ABC-транспортеров в опухоли в процессе химиотерапии обуславливает отсутствие ответа на химиотерапию, а снижение экспрессии ABC-транспортеров – хороший ответ на НАХТ. Показано индивидуальное повышение или снижение экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении химиотерапии и связи с этими изменениями экспрессии ответа на химиотерапию, т.е. наши исследования четко показали, что в реализации эффекта НАХТ играет роль не предсуществующая, а адаптивная (изменяемая в процессе лечения) множественная лекарственная устойчивость. С практической точки зрения наши данные обосновывают новую стратегию управления множественной лекарственной устойчивостью через регулирование экспрессии ABC-транспортеров.

Высокий уровень экспрессии ABC-транспортеров и их продуктов в опухолевых клетках не обеспечивает устойчивость к химиопрепаратам и не имеет прогностическую значимость. Из числа всех исследованных генов только уровень экспрессии гена *ABCB3* в опухоли до лечения показал слабую связь с эффективностью НАХТ и с безметастатической выживаемостью. Впервые было показано, что изменение экспрессии генов ABC-транспортеров при воздействии химиопрепаратов, в отличие от исходного уровня экспрессии, имеет прогностическую значимость. Повышение экспрессии *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в процессе НАХТ является неблагоприятным прогностическим признаком, а снижение экспрессии этих генов в опухолевой ткани имеет благоприятную прогностическую значимость. Таким образом, в результате исследования был впервые установлен новый информативный прогностический фактор – изменение экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы, который может быть определен при проведении НАХТ. Повышение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в процессе химиотерапии является неблагоприятным прогностическим признаком, а снижение экспрессии этих генов – благоприятным прогностическим признаком. Из прогностических факторов, которые могут использоваться после НАХТ, в настоящее время используются только оценка эффекта и лекарственный патоморфоз (при полной морфологической

регрессии (не более 14% случаев) благоприятный исход). Однако, большинство опухолей в процессе НАХТ конвенциональными препаратами не достигают полной регрессии, поэтому применение этого прогностического фактора сильно ограничено. Мы установили новый прогностический фактор, который как раз работает у больных с частичной регрессией и стабилизацией процесса. Новый прогностический фактор не зависит от стандартных клиничко-патологических факторов прогноза (лимфогенного метастазирования, размера опухоли молочной железы, рецепторного статуса, молекулярных подтипов, гистологической формы роста опухоли и др.), что значительно расширяет диапазон его возможного использования, которое может существенно повысить эффективность прогнозирования исхода РМЖ.

В последнем разделе главы 3 проводилось сравнение уровня экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* до лечения и после НАХТ, и определялось направление изменения их экспрессии. В результате впервые у больных был обнаружен градиентный феномен, который можно определить как однонаправленное изменение опухолевой экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* в процессе НАХТ в строгом соответствии с эффектом химиотерапии. Если изменение экспрессии всех 5-ти или 4-х генов совпадало с эффектом НАХТ (при повышении экспрессии – отсутствие клинического эффекта НАХТ, при снижении экспрессии – частичная регрессия), то у больного констатировали наличие градиентного феномена. Если изменение экспрессии генов МЛУ в процессе НАХТ было разнонаправленным и изменение хотя бы 2-х и более из 5-ти генов не соответствовало эффекту НАХТ, у таких пациентов констатировали отсутствие градиентного феномена. Было отмечено, что градиентный феномен наблюдался у 80 (75%) из 106 обследованных больных и отсутствовал у 26 (25%) больных. Градиентный феномен показал существенную клиническую значимость. Было установлено, что при наличии градиентного феномена пятилетняя безметастатическая выживаемость составила 73% против 39% у больных без градиентного феномена (log-rank test $p=0,0018$). Это позволяет рассматривать наличие градиентного феномена у пациентов в качестве благоприятного прогностического фактора. Таким образом, градиентный феномен имеет высокозначимую связь с развитием метастатической болезни при раке молочной железы. В результате этого исследования был впервые установлен совершенно новый прогностический фактор, не зависящий от основных клиничко-патологических факторов прогноза. Предполагается, что градиентный феномен является маркером наличия или отсутствия в опухолевых клетках сбалансированной системы генной регуляции и реактивности. Наличие/отсутствие градиентного феномена – это еще один

новый прогностический фактор, который позволяет прогнозировать исход РМЖ на этапах лечения после предоперационной химиотерапии.

Подытоживая 3 главу диссертационной работы, хочется сказать, что для понимания механизмов формирования адаптивной множественной лекарственной устойчивости необходимо понять, почему при использовании одной и той же схемы лечения у одних больных происходит снижение экспрессии генов ABC в опухоли и это сочетается с хорошим эффектом, а у других происходит повышение экспрессии генов ABC и это обуславливает плохой ответ? Ответу на этот вопрос будет посвящена 4 глава настоящей работы.

ГЛАВА 4 РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ АВС-ТРАНСПОРТЕРОВ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Повышение и снижение экспрессии АВС-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ и связь этих изменений экспрессии генов АВС с эффективностью НАХТ и прогнозом – это тот феномен, который был впервые установлен в наших исследованиях. При этом, повышение экспрессии генов АВС-транспортеров в процессе химиотерапии является универсальным механизмом, характерным для всех основных генов АВС, который определяет формирование адаптивной МЛУ и резистентность опухоли молочной железы к химиопрепаратам. Повышение экспрессии генов АВС в ответ на химиопрепараты является нормальной реакцией клеток (в том числе и опухолевых) в ответ на химиопрепараты, исходя из физиологической функции АВС-транспортеров, и потому феномен повышения экспрессии этих генов в процессе химиотерапии широко известен в литературе и во многом понятны механизмы активации системы АВС-транспортеров [Chen K.G., et al., 2012]. Прежде всего, увеличение экспрессии генов МЛУ после НАХТ связано с индукцией экспрессии этих генов в опухолевых клетках. Практически все известные механизмы направлены на индукцию экспрессии АВС-транспортеров в ответ на многие внешние воздействия. Большинство проводящих путей Raf/MEK/ERK, MAPK и JNK индуцируют экспрессию АВС-транспортеров лекарственных средств [Sui H., et al., 2012, Weinstein-Oppenheim C.R., et al., 2001]. Должно быть принято во внимание и то, что во многих случаях экспрессия генов АВС-транспортеров обратно пропорциональна уровню экспрессии нескольких микроРНК. В свою очередь, ингибция активности микроРНК может быть модулирована химиотерапевтическими препаратами через повреждение ДНК, деметилирование ДНК и диацетилирование гистонов, которые сочетаются с быстрым изменением уровней микроРНК [Hu H., et al., 2011, Iorio M.V., et al., 2012].

Феномен снижения экспрессии в образцах после НАХТ относительно биопсийных образцов до лечения и его клиническая значимость впервые был установлен в наших исследованиях. Только в одной клинической работе мы находим прямое подтверждение феномена снижения [Kim B., et al., 2013, Linn S.C., et al., 1997]. В опытах *in vitro* на опухолевых линиях не было показано снижения экспрессии генов МЛУ под действием химиопрепаратов, хотя проводились исследования механизмов регуляции экспрессии генов АВС. Отсюда вытекают важные логические предположения, которые будут подробно рассмотрены в этой главе: либо снижение экспрессии в ответ на химиопрепараты является следствием несовершенства методических подходов измерения

и их интерпретации, в противном случае следует полагать, что снижение проявляется только в клинических условиях, а значит обусловлено индивидуальными факторами опухоли, микроокружения и является атрибутом aberrантной опухоли *in vivo*.

К таким факторам могут относиться эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов ABC, в частности, метилирование промоторных регионов. Известный факт – продукт гена-супрессора опухолевого роста p53 дикого типа down-регулирует транскрипцию ABC-транспортеров [Johnson R.A., et al., 2001, Thottassery J.V., et al., 1997], в то время как мутантный p53 активирует экспрессию генов ABC [Sampath J., et al., 2001]. Морфологическая гетерогенность в опухоли молочной железы, которая проявляется как наличие пяти различных морфологических типов инфильтративного компонента (морфологических структур), отражающих архитектурное устройство опухоли, имеет влияние эффективность НАХТ [Завьялова М.В., и др., 2008] и морфологические структуры могут отличаться по генной экспрессии ABC-транспортеров. Аберрации, избыточные в солидных опухолях, могут отражаться на регуляции экспрессии ABC-транспортеров в системе *in vivo*, наконец, клональная эволюция опухоли, определяемая изменением опухолевых клонов в процессе НАХТ и снижением количества опухолевых клеток [Greaves M., et al., 2012], экспрессирующих гены ABC, вследствие некроза клеток во время химиотерапии, несомненно, вносит свой вклад. Кроме того, снижение экспрессии может быть связано с тем, что операция выполнялась через 4-5 недель после последнего курса НАХТ и экспрессия ABC-транспортеров в пост-НАХТ образцах опухоли могла вернуться нормальному уровню естественным образом.

Фактически 4 глава будет посвящена решению проблемы поиска путей и факторов регуляции экспрессии ABC-транспортеров, которые объясняют вариабельность индивидуального ответа опухоли больного на НАХТ, поскольку, как было установлено в 3 главе, эту вариабельность определяет изменение экспрессии генов ABC в процессе химиотерапии. Прежде всего, будут представлены доказательства существования феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ, одного из главных «маркеров» ответа опухоли на химиотерапию.

4.1 Доказательство феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ

Мы задались целью доказать действительное существование феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров. Прежде всего, полностью исключается возможность технической ошибки при проведении ПЦР в режиме реального времени, поскольку было проведено множество отработочных экспериментов и все исследования проводились в нескольких, в том числе и в независимых повторах. Кроме того, ПЦР в режиме реального времени считается «золотым» стандартом для оценки экспрессионной активности генов ABC-транспортеров [Gillet J.P., et al., 2011].

Итак, приступим, воспользуемся известным в математике приемом доказательства «от противного». Предположим, что факта снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ не существует и «мнимое» снижение объясняется несовершенством методических подходов для измерения экспрессии ABC-транспортеров, а именно тем, что нельзя измерить экспрессию генов МЛУ во множестве точек в процессе проведения химиотерапии. Проведение 4 курсов НАХТ это достаточно длительный процесс, обычно 1 курс химиотерапии укладывается в 1 неделю и две недели оставляется пациентам на отдых и проведение восстановительных мероприятий (купирование побочных эффектов). При хорошем стечении обстоятельств 4 курса НАХТ проводится в течение 3 месяцев. При этом после 4 курсов химиотерапии проходит еще 3-5 недель до оперативного вмешательства, во время которого забиралась вторая часть материала для исследования. Таким образом, первая и вторая точки нашего исследования экспрессии ABC-транспортеров отстояла друг от друга на 4-5 месяцев. Предполагается, что никакого реального снижения экспрессии ABC-транспортеров нет, а наблюдаемое нами «снижение» всего лишь результат естественного убывания экспрессии в промежутке между последним курсом НАХТ и операцией, поскольку индуцирующий фактор (химиотерапия) перестал действовать. На рисунке 16 иллюстрируются это предположение и показаны как реализуются наблюдаемые случаи «повышения» и «снижения» экспрессии генов ABC.

Итак, учитывая, что снижения экспрессии генов ABC-транспортеров по действием химиопрепаратов *in vitro* не установлено и не известны даже возможные механизмы такого снижения, предполагается, что под действием химиопрепаратов «всегда» происходит только повышение экспрессии ABC-транспортеров в клетках опухоли и больные (с зарегистрированным «снижением» - CD и «повышением» - AB) отличаются только по «скорости» естественного убывания экспрессии генов ABC сразу после того,

как химиопрепараты перестали действовать или по продолжительности адаптивного повышения экспрессии генов ABC в ответ на лечения.

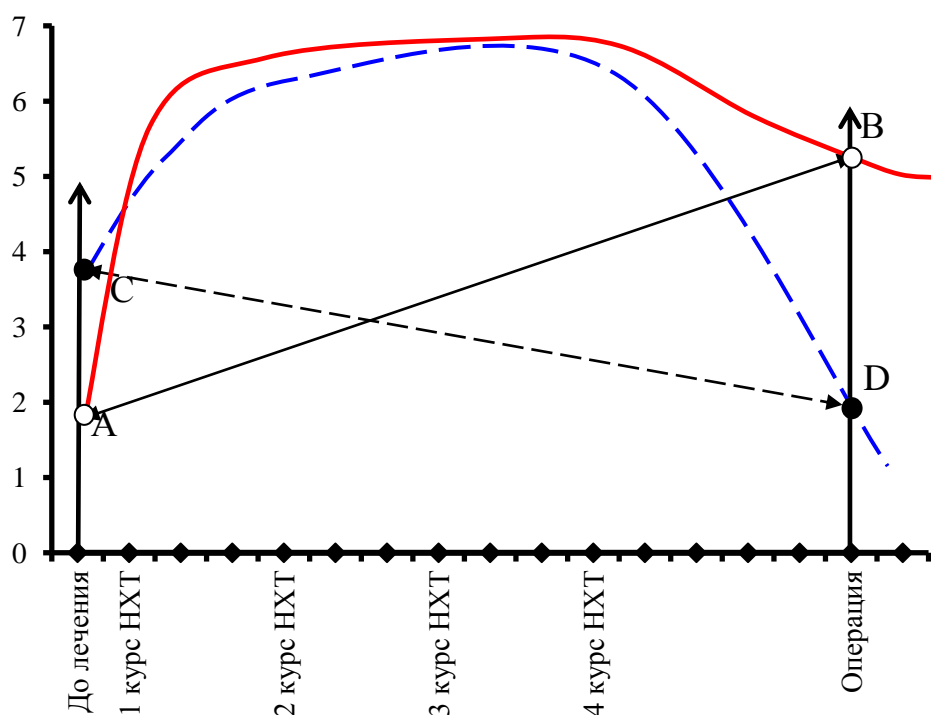


Рисунок 16. – Иллюстрация гипотезы о мнимом снижении

Примечание: точки А и В показывают, как реализуется «повышение» экспрессии генов ABC-транспортеров, а точки С и D демонстрируют, как происходит «снижение» экспрессии генов ABC. Промежутки между ромбовидными знаками на оси абсцисс – недели. Кривые (сплошная и пунктирная) – «истинная» экспрессия генов ABC в соответствии с гипотезой.

Как утверждал А.Энштейн, - «Никаким количеством экспериментов нельзя доказать теорию; но достаточно одного эксперимента, чтобы ее опровергнуть». Для опровержения нашего предположения был проведен достаточно простой по дизайну эксперимент. У 25 пациентов мы проанализировали экспрессию ABC-транспортеров в четырех точках: до лечения, на 7 сутки после начала 1 курса НАХТ, на 21 сутки (окончание курса) после начала 1 курса НАХТ и в операционном материале через 3-5 недель после всех курсов НАХТ. Результаты оценки уровня экспрессии гена *ABCB1* у некоторых из этих больных (представлено выборочно несколько больных) в процессе НАХТ показаны на рисунке 17. Хорошо видно, что на 7-е сутки у нескольких пациентов наблюдается отчетливое снижение экспрессии гена *ABCB1*. За такой короткий период крайне маловероятно то, что успеет произойти повышение с последующим естественной нормализацией экспрессии генов ABC, как это предполагалась, следовательно, предположение несостоятельно, и можно констатировать, что снижение экспрессии ABC-транспортеров при воздействии химиопрепаратов все-таки существует.

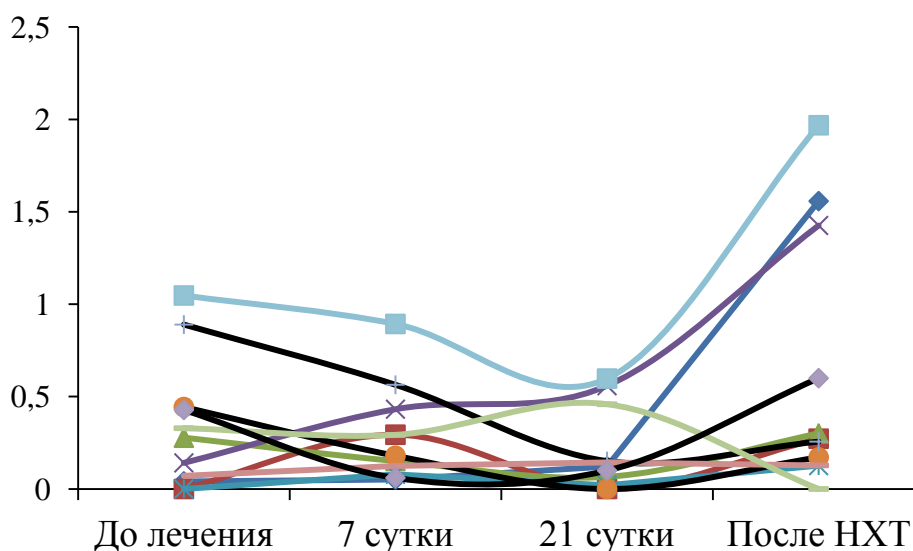


Рисунок 17. – Динамика экспрессии гена *ABCB1* в опухолевой ткани молочной железы при проведении НАХТ.

Второй вопрос, который возникает в связи с нашим предположением – какова продолжительность адаптивного повышения экспрессии ABC-транспортёров в ответ на лечение, или насколько долго сохраняется повышенная экспрессия генов ABC в опухоли, после прекращения химиотерапии. Этот вопрос в свое время поставил [Leonard G.D., et al., 2003], который писал, что «существенный интерес представляют так называемые "адаптационные изменения", в условиях которых большинство клеток популяции оказывается устойчивыми к химиотерапии за счет временной активации экспрессии генов ABC, под действием цитостатических препаратов. Эти изменения и связь их с развивающейся впоследствии стабильной МЛУ изучены мало и представляют значительный теоретический и практический интерес».

Мы проанализировали время проведения химиотерапии и оперативного вмешательства по историям болезни больных, и обнаружили, что в редких случаях период между последним курсом химиотерапии и оперативным вмешательством существенно превышал 5 недель и составлял 3 месяца, в течение которых проводили восстановительные мероприятия. У нескольких больных повышенная, относительно исходного уровня, экспрессия генов ABC сохранялась все эти три месяца. В тоже время были случаи, когда операцию проводили уже через 10 дней после окончания курсов НАХТ. У отдельных пациентов снижение экспрессии относительно исходного уровня наблюдались уже через эти 10 дней после окончания курсов НАХТ. Эти результаты свидетельствует о том, что продолжительность адаптивного повышения экспрессии ABC-транспортёров в ответ на лечение зависит от индивидуальных особенностей пациентов и их опухолей. Мы провели корреляционный анализ связи времени между последним

курсом НАХТ и операцией и уровнем экспрессии ABC-транспортеров в операционном материале. Корреляции не было, т.е. уровень экспрессии генов ABC не зависел от продолжительности периода между окончанием НАХТ и операцией. Это еще раз подтверждает отсутствие процесса нормализации уровня экспрессии генов ABC, по крайней мере, во временном промежутке 3 месяца.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования можно сделать вывод о том, что феномен снижения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при воздействии химиопрепаратов действительно существует. Актуальным является исследование возможных механизмов его реализации в условиях проведения химиотерапии.

4.2 Экспрессия белков ABC-транспортёров в опухоли молочной железы

Исследование было выполнено на операционном материале больных после НАХТ. Забор тканей проводился в течение первого часа после выполнения радикальной мастэктомии или органосохраняющих операций. Взятые образцы помещались в 10% рН-нейтральный формалин. Оценивали частоту опухолевых клеток, экспрессирующих белки ABC-транспортёров в различных морфологических структурах инфильтративного компонента опухоли. Оценивали наличие экспрессии белка ABC в строме и воспалительном инфильтрате.

В операционном материале после проведения НАХТ 38 больных была изучена экспрессия 6-ти белков МЛЮ: *Mvp* – продукта гена *MVP*, *Vscrp1* – продукта гена *ABCG1*, *Vscrp* – продукта гена *ABCG2*, *Mrp1* – продукта гена *ABCC1*, *Mrp2* – белка гена *ABCC2* и Р-гликопротеина – продукта гена *ABCB1*.

Экспрессия белков ABC после проведения НАХТ практически никак не зависела от основных клинико-патологических параметров. Была только установлена связь экспрессии *Vscrp1* с лимфогенным метастазированием (таблица 18). У больных с лимфогенными метастазами экспрессия этих белков была статистически значимо ниже, чем у больных без лимфогенных метастазов. Другие клинико-патологические факторы: возраст, размер опухоли, менструальный статус, схема НАХТ, гистологическая форма, рецепторный статус, степень злокачественности, молекулярные подтипы не были связаны с экспрессией белков химиорезистентности (данные не представлены).

Таблица 18. – Экспрессия белков химиорезистентности в опухоли молочной железы после НАХТ в зависимости от лимфогенного метастазирования.

Белок	% опухолевых клеток, экспрессирующих белок		n1	n2	p-value
	N ₀	N ₁₋₃			
<i>Mvp</i>	17,6±7,2	20,6±8,3	16	19	0,789
<i>Vscrp1</i>	21,4±8,1	1,3±0,5	17	16	0,022
<i>Vscrp</i>	52,2±11,0	52,1±11,0	17	16	0,997
<i>Mrp1</i>	45,6±11,5	57,7±9,2	14	14	0,419
<i>Mrp2</i>	1,1±0,6	0,0±0,0	17	16	0,095
Р-гликопротеин	9,4±4,3	7,3±3,4	17	16	0,714

Уровень доверительной вероятности p-value по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни; полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Экспрессия белков ABC-транспортёров слабо коррелировала с уровнем экспрессии генов ABC. На рисунке 18 представлены коэффициенты корреляции по Спирмену между частотой белок-положительных опухолевых клеток и уровнем экспрессии мРНК гена.

Частота опухолевых клеток, экспрессирующих Mrp1 и Pgp коррелирует с уровнем экспрессии мРНК генов *ABCC1* и *ABCB1* соответственно. Однако эта корреляция достаточно слабая. К сожалению ИГХ метод не позволяет количественно оценить уровень экспрессию белков в клетках и поэтому отсутствие корреляции не говорит об отсутствии связи мРНК и белков ABC-транспортеров. Надо еще учитывать варианты регуляции трансляции. В то же время, корреляция частоты опухолевых клеток, экспрессирующих белки ABC и мРНК генов ABC-транспортеров, свидетельствует о том, что изменение экспрессии связано не только с изменением уровня экспрессии, но и с изменением количества клеток, экспрессирующих ABC-транспортеры.

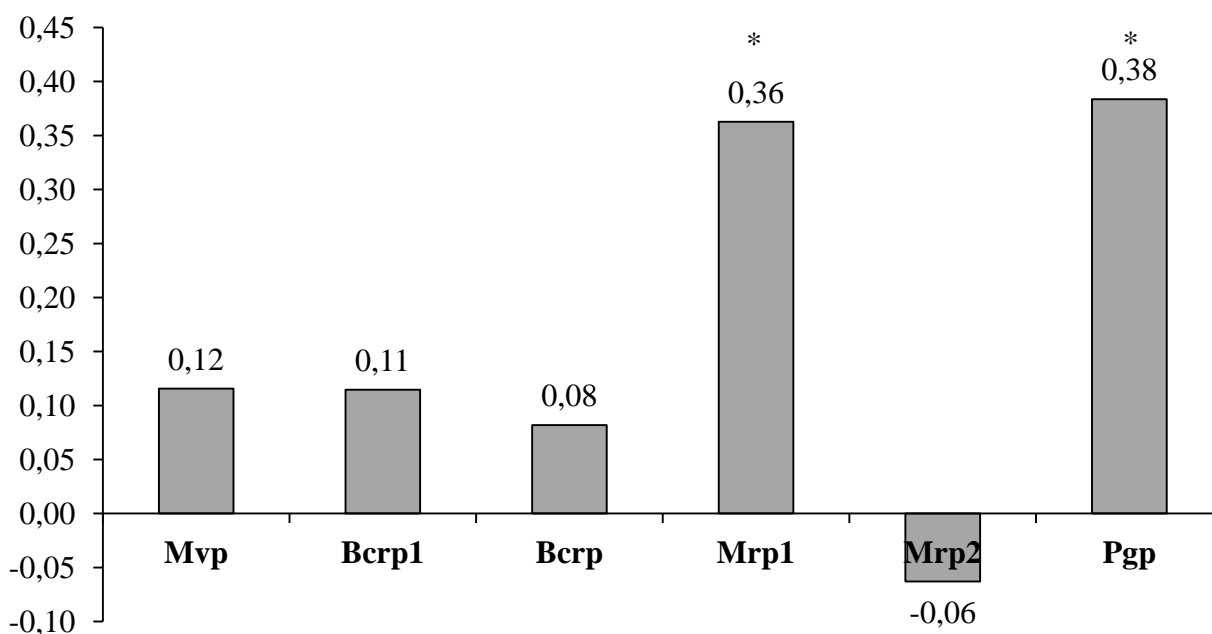


Рисунок 18. – Коэффициенты корреляции частоты опухолевых клеток, экспрессирующих белки МЛУ и мРНК генов МЛУ в опухоли молочной железы после НАХТ
* – корреляция статистически значима.

В статье Faneyte (2002), также как и в нашей работе не было показано корреляции экспрессии белка Bcrp и мРНК гена *ABCG2* [Faneyte I.F., et al., 2002]. В исследовании Atalay (2006) отмечалась корреляция наличия экспрессии генов и белков *ABCB1* и Р-гликопротеина, *ABCC1* и белка Mrp1 [Atalay S., et al., 2006], что согласуется и с нашими результатами. В своем исследовании Kim (2013) полуколичественно оценивал уровень экспрессии Pgp, Bcrp и Mrp1 в опухолевых клетках и обнаружил как уменьшение, так и увеличение уровня экспрессии данных белков в процессе НАХТ [Kim B., et al., 2013].

Согласно нашим результатам, если у больных в опухоли при проведении НАХТ наблюдается снижение экспрессии мРНК генов *MVP*, *ABCG2*, *ABCC1* и *ABCB1*, то у таких пациентов в опухоли после НАХТ отмечается низкий процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки: Mvp, Bcrp, Mrp1 и Р-гликопротеина, по сравнению с пациентами,

у которых экспрессия мРНК генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ повышается (рисунок 19). Это еще раз подтверждает существование феномена снижения экспрессии генов МЛУ в ответ на химиопрепараты. При снижении экспрессии мРНК гена ABC отмечается и низкая частота опухолевых клеток, экспрессирующих белок ABC. Это напрямую показывает, что снижение экспрессии ABC-транспортеров определяется, прежде всего, уменьшением экспрессирующих опухолевых клеток. Скорее всего, за счет их гибели в процессе неoadъювантной химиотерапии, хотя не исключены и другие механизмы.

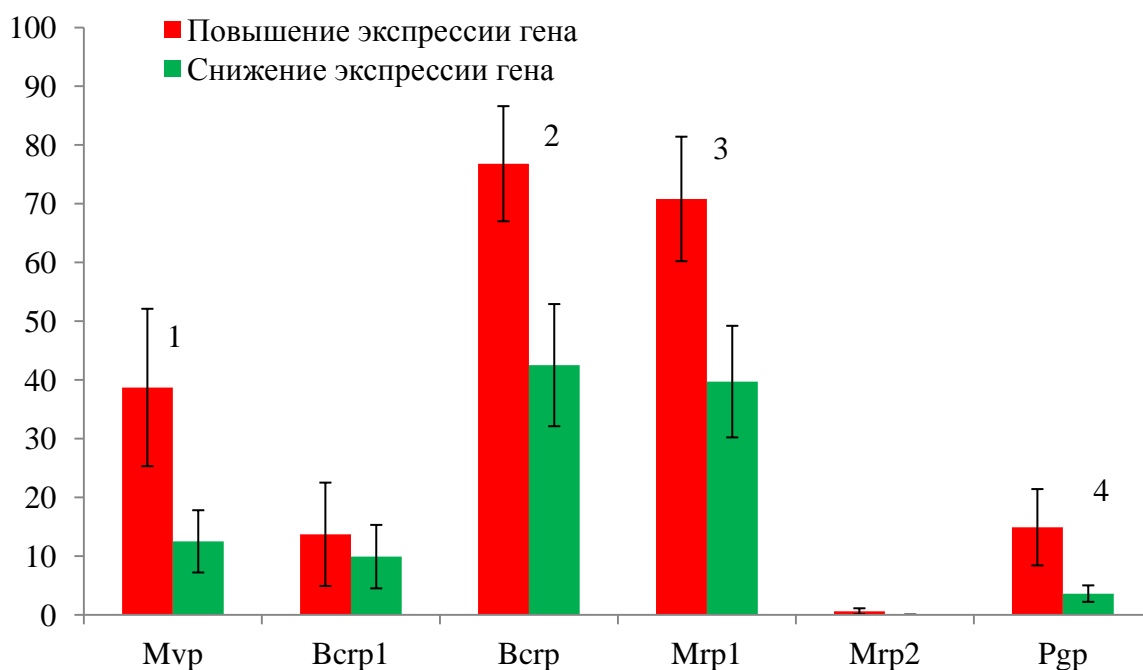


Рисунок 19. - Экспрессия белков химиорезистентности в опухоли молочной железы после НАХТ в зависимости от изменения экспрессии их генов.

Примечание: уровень значимости по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни; 1 – $p = 0,035$; 2 – $p = 0,027$; 3 – $p = 0,039$; 4 – $p = 0,028$.

Экспрессия белков ABC после НАХТ связана с эффектом химиотерапии. Частота опухолевых клеток, экспрессирующих белки Mvp и Bcrp статистически значимо ниже у пациентов с объективным ответом на НАХТ, по сравнению с опухолью после НАХТ у больных с отсутствием ответа на химиотерапию (таблица 19). Это согласуется с результатами исследований нескольких авторов [Faneyte I.F., et al., 2002, Nakanishi T., et al., 2012]. Австрийские ученые же, напротив, не показали связи уровня экспрессии белка Mvp после НАХТ с ответом на химиотерапию [Rudas M., et al., 2003].

Таблица 19. – Экспрессия белков химиорезистентности в опухоли молочной железы после химиотерапии в зависимости от эффективности НАХТ.

Белок	% опухолевых клеток, экспрессирующих белок		N1	N2	p value
	Отсутствие ответа	Объективный ответ на НАХТ			
Mvp	42,0±9,0	7,4±2,5	12	23	0,043
Vscr1	18,3±7,5	7,3±3,3	13	20	0,357
Vscr	70,1±7,7	41,8±7,7	13	20	0,045
Mrp1	60,8±10,1	44,0±6,4	12	15	0,241
Mrp2	0,6±0,5	0,6±1,2	13	20	0,941
P-гликопротеин	11,5±4,2	6,4±3,0	13	20	0,926

Примечание: уровень доверительной вероятности p value по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни; полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Таким образом, при снижении экспрессии в опухоли молочной железы мРНК генов *MVP*, *ABCG2*, *ABCC1* и *ABCB1* в операционном материале отмечается низкая частота клеток, экспрессирующих соответствующие этим генам белки: Mvp, Vscr, Mrp1 и P-гликопротеин, по сравнению с пациентами, у которых экспрессия мРНК генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ повышается, что подтверждает феномен снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ на уровне белков.

4.3 Экспрессия ABC-транспортёров и внутриопухолевая морфологическая гетерогенность

Опухоль молочной железы является одним из наиболее гетерогенных новообразований, в настоящее время, выделяют около 30 гистологических типов и подтипов рака молочной железы [Weigelt B., et al., 2010]. Индивидуально каждая опухоль еще характеризуется и внутриопухолевой гетерогенностью [Bertos N.R., et al., 2011, Ng C.K., et al., 2012], в том числе и морфологической внутриопухолевой гетерогенностью. Хорошо известно, что морфологическая структура первичной опухоли связана с исходом заболевания, инвазией, лимфогенным и отдаленным метастазированием [Perel'muter V., et al., 2008, Winchester D., et al., 2000, Zavjalova M.V., et al., 2006, Zavyalova M.V., et al., 2011, Перельмутер В.М., и др., 2007]. Даже стандартная гистологическая оценка опухоли молочной железы, как правило, включает несколько параметров, в том числе: обследование на наличие в опухоли тубулярных формаций, митотическое число и ядерную атипию. Эти показатели играют важную роль в идентификации пациентов с высоким риском отдаленного метастазирования. Хорошо известно, что высокодифференцированные опухоли молочной железы связаны с повышенным риском рецидивирования и гематогенного метастазирования. Инвазия опухоли в кровеносные сосуды и периневральное пространство, высокая пролиферативная активность опухолевых клеток также считают факторами, определяющими плохой результат [Bateman A.C., 2007, Komaki K., et al., 2006, Lønning P., 2007, Weigelt B., et al., 2010]. Среди опухолей молочной железы наиболее частым гистологическим типом (более 80% опухолей молочной железы) является инвазивный протоковый рак [Phipps A.I., et al., 2010, Rosen P.P., 2001, Sobin L.H., et al., 2010, O'Malley F.P., et al., 2011].

Исследования морфологической внутриопухолевой гетерогенности представляют особый интерес, в плане оценки прогноза именно для пациентов с инвазивным протоковым раком молочной железы. Одной из причин этого является то, что в большинстве случаев инвазивный протоковый рак достаточно однороден по стандартным морфологическим факторам: имеет в большинстве своем 2-ю степень злокачественности, инвазия в кровеносные сосуды и периневральное пространство отсутствует [Bloom H., et al., 1957, Pereira H., et al., 2007, Rakha E.A., et al., 2010]. Было установлено, что инвазивно-протоковая карцинома молочной железы показывает высокую степень внутриопухолевой морфологической гетерогенности, которая связана с различным клиническим прогнозом. Инфильтративный компонент инвазивного протокового рака, помимо тубулярных структур, наличие которых стандартно учитывается при определении степени

злокачественности [Bloom H., et al., 1957, Pereira H., et al., 2007, Rakha E.A., et al., 2010], представлен и другими морфологическими типами структур: трабекулярными, солидными, альвеолярными и дискретными группами опухолевых клеток. Получены данные о прогностическом значении альвеолярных структур для лимфогенного метастазирования, а соотношения трабекулярных и тубулярных структур – для гематогенного [Perel'muter V.M., et al., 2008, Winchester D., et al., 2000, Zavjalova M.V., et al., 2006, Zavyalova M.V., et al., 2011, Перельмутер В.М., и др., 2007]. В настоящее время, исследование внутриопухолевой гетерогенности, являются ключевым направлением для развития персонализированных подходов в лечении рака [Bhatia S., et al., 2012, Saunders N.A., et al., 2012, Turner N.C., et al., 2012]. В 2008 году мы показали ассоциацию внутриопухолевой морфологической гетерогенности инвазивной протоковой карциномы молочной железы с эффективностью неоадьювантной химиотерапии [Zavyalova M.V., et al., 2008]. На рисунке 20 представлены все типы морфологических структур паренхимитатозного компонента опухоли молочной железы. Если учитывать эпителиально-стромальное взаимодействие морфологических типов инфильтративного компонента инвазивной протоковой карциномы молочной железы, то их можно разделить на три основные категории. Первая категория, включает тубулярные и трабекулярные структуры, все опухолевые клетки близко связаны друг с другом и со стромой. Этот факт показывает, что опухолевые клетки в состоянии экспрессировать молекулы кадгерин-катенинового комплекса, ответственного межклеточные взаимодействия. Кроме того, опухолевые клетки тубулярных и трабекулярных структур, по-видимому, экспрессируют рецепторы интегрин, которые служат для соединения клеток с базальной мембраной и соединительной тканью. Во вторую категорию входят альвеолярные и солидные структуры, для которых характерны опухолевые клетки не контактирующие со стромой, за исключением внешнего слоя клеток, связанных с соединительной тканью. Большинство опухолевых клеток в пределах альвеолярных и солидных структур экспрессируют кадгерин-катениновые молекулы, но лишено рецепторов интегрин для взаимодействия со стромой. Третья категория, представлена дискретными группами клеток, для которых характерно отсутствие экспрессии белков межклеточного взаимодействия, но сохраняется способность экспрессировать интегрины.

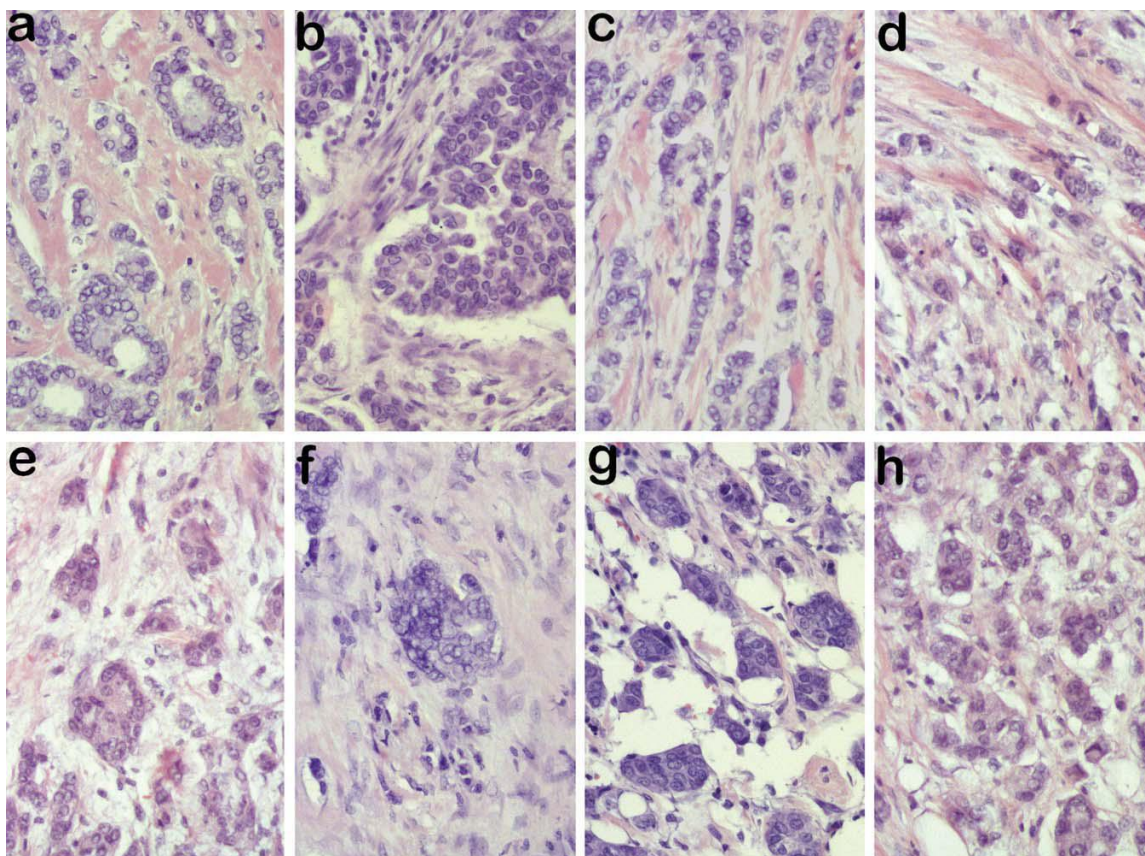


Рисунок 20. – Морфологические типы инфильтративного компонента инвазивной протоковой карциномы молочной железы: а) тубулярные структуры; б) солидные структуры; в) трабекулярные структуры; д) дискретные группы клеток; е-н) различные варианты альвеолярных структур. Опухолевая ткань окрашена гематоксилином и эозином (200х увеличение) (по нашей публикации [Zavyalova M.V., et al., 2011]).

В опухоли молочной железы могут присутствовать одновременно все описанные выше морфологические структуры. Можно полагать, что различные морфологические структуры отражают фенотипическое разнообразие опухоли, обусловленное различными генетическими альтерациями [Zavyalova M.V., et al., 2011].

В таблице 20 показана ассоциация между ответом на НАХТ и наличием/отсутствием различных типов морфологических структур в опухоли молочной железы. Пациенты с альвеолярными структурами в опухоли были менее чувствительны к НАХТ, чем больные, у которых в опухоли не было альвеолярных структур. Частота больных, у которых отсутствовал ответ на НАХТ в группе с альвеолярными структурами, составила 61,9 %, а в группе больных без альвеолярных структур 46,4% ($p = 0,0028$). Также и больные с трабекулярными структурами в опухоли чаще показывали устойчивость к химиотерапии, по сравнению с опухолями без этих структур (58,8% против 45,3%; $p = 0,0272$). Примечательно, что при наличии в опухоли трабекулярных структур не зафиксировано ни одного случая полной морфологической регрессии.

Таблица 20. – Ответ на НАХТ в зависимости от наличия различных типов морфологических структур в опухоли молочной железы.

Морфологические структуры		n	Объективный ответ, N (%)	Нет ответа, N (%)	p value
Альвеолярные	нет	151	81 (53,6)	70 (46,4)	0,003
	есть	231	88 (38,1)	143 (61,9)	
Трабекулярные	нет	86	47 (54,7)	39 (45,3)	0,036
	есть	296	122 (41,2)	174 (58,8)	
Тубулярные	нет	248	111 (44,8)	137 (55,2)	0,829
	есть	134	58 (43,3)	76 (56,7)	
Солидные	нет	225	102 (45,3)	123 (54,7)	0,676
	есть	157	67 (42,7)	90 (57,3)	
Дискретные группы клеток	нет	155	68 (43,9)	87 (56,1)	0,917
	есть	227	101 (44,5)	126 (55,5)	

Примечание: уровень доверительной вероятности p value по двухстороннему критерию Фишера (<http://vassarstats.net/odds2x2.html>), полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Полученные результаты продемонстрировали, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы, оказывает существенное влияние на эффективность неоадьювантной химиотерапии. В данном исследовании на более представительном материале, чем это было ранее [Завьялова М.В., и др., 2008], мы, с большей доверительной вероятностью, подтвердили ассоциацию между наличием альвеолярных структур и трабекулярных структур в инфильтративном компоненте карциномы молочной железы и отсутствием ответа на НАХТ. Эффективность химиотерапии обусловлена многими факторами организма хозяина и изменениями, которые происходят в опухоли [Gottesman M.M., 2002]. В настоящее время, бесспорно, что мажорным механизмом химиорезистентности опухоли молочной железы является экспрессия ABC-транспортеров, выбрасывающих лекарственные средства из опухолевых клеток против градиента концентрации [Gillet J.P., et al., 2012]. Нами было высказано предположение о том, что различные типы морфологических структур характеризуются различной экспрессией генов ABC-транспортеров, что объясняет их разный вклад в эффективность НАХТ. Мы сравнили уровень экспрессии генов ABC в опухолевой ткани молочной железы до лечения и после НАХТ при наличии или отсутствии в ней разных типов морфологических структур. Эти данные представлены в таблице 21. Установлено, что экспрессия генов *ABCB1* ($p = 0,007$) и *ABCC5* ($p = 0,027$) была значительно ниже в опухоли после НАХТ с тубулярными структурами по сравнению с опухолью без тубулярных структур. Пациенты с солидными структурами показали сниженную экспрессию генов *ABCB1* ($p = 0,011$) и *ABCG2* ($p = 0,002$) в пост-НАХТ образцах, по сравнению с опухолью, не содержащей солидные структуры. Обращает на себя внимание,

что повышенная экспрессия ABC-транспортеров, которая обуславливает химиорезистентность, наблюдается в образцах опухоли после НАХТ только в случае отсутствия солидных или тубулярных структур. Эти данные не поддерживают наше предположение о том, что различные типы морфологических структур характеризуются различной экспрессией генов ABC-транспортеров, что объясняет их разный вклад в эффективность НАХТ. Тем более, что повышенная экспрессия генов МЛУ не отмечается при наличии в опухоли альвеолярных или трабекулярных структур, для которых установлена связь с эффектом НАХТ (таблица 20).

Интересные результаты получены по гену *ABCB3*, уровень экспрессии которого был статистически значимо ниже в опухоли (до лечения и после НАХТ) с альвеолярными структурами и в опухоли с трабекулярными структурами (до лечения). Согласно ранее представленным данным (таблица 8) у больных с отсутствием ответа на НАХТ отмечается низкий уровень экспрессии гена *ABCB3* в опухоли до лечения, а у больных с объективным ответом отмечается высокий уровень экспрессии *ABCB3*. Эти данные согласуются с результатами оценки связи с морфологическими структурами в опухоли, т.е. низкий уровень *ABCB3* связан с альвеолярными и трабекулярными структурами, плохим ответом на НАХТ и альвеолярные и трабекулярные структуры также связаны с плохим ответом на НАХТ. Это свидетельствует о том, что механизмом, обуславливающим химиорезистентность альвеолярных и трабекулярных структур (показано в таблице 20) может являться сниженная экспрессия гена *ABCB3*, который не является классическим геном лекарственной устойчивости и его продукт не выбрасывает химиопрепараты из опухолевых клеток. Известно, что белок *Abcb3* участвует в презентации антигенов вместе и молекулами МНС1, в связи с чем предполагается, что высокий уровень экспрессии гена *ABCB3*, за счет усиления презентации антигенов, способствует усилению CD8+ Т-лимфоцитарного иммунного ответа в опухоли молочной железы, которое и обуславливает повышение эффективности НАХТ.

Таблица 21. – Связь уровня экспрессии генов ABC-транспортеров в опухоли до лечения и после НАХТ с наличием/отсутствием различных типов морфологических структур.

Экспрессия генов		Альвеолярные		Трабекулярные		Тубулярные		Солидные		Дискретные группы опухолевых клеток	
		нет	есть	нет	есть	нет	есть	нет	есть	нет	есть
<i>ABCB1</i>	До лечения	4,17±1,31	4,78±1,29	2,77±0,79	5,21±1,29	6,84±1,97	3,09±0,95	4,73±1,22	4,51±1,52	5,94±2,30	3,99±1,00
	После НАХТ	4,63±1,44	5,72±1,39	4,10±1,32	5,85±1,37	8,72±2,31	3,16±0,74¹	8,20±2,16	3,15±0,70³	6,07±1,58	5,12±1,41
<i>ABCB3</i>	До лечения	1,19±0,18	0,79±0,11⁵	1,33±0,19	0,73±0,10⁷	0,99±0,16	0,85±0,12	0,91±0,13	0,91±0,13	1,03±0,19	0,86±0,11
	После НАХТ	1,37±0,58	0,60±0,09⁶	1,27±0,65	0,67±0,09	0,92±0,44	0,76±0,10	0,61±0,12	0,99±0,31	0,58±0,12	0,94±0,26
<i>ABCC1</i>	До лечения	1,12±0,18	1,60±0,31	0,93±0,12	1,64±0,30	1,40±0,24	1,51±0,36	1,51±0,36	1,43±0,31	2,02±0,57	1,21±0,21
	После НАХТ	1,13±0,24	2,80±1,12	1,25±0,34	2,70±1,07	3,56±1,94	1,52±0,36	3,21±1,75	1,64±0,40	1,38±0,25	2,80±1,19
<i>ABCC2</i>	До лечения	3,22±1,17	4,82±1,16	2,76±1,02	4,66±1,10	4,05±0,93	4,09±1,41	4,41±1,19	3,75±1,12	2,72±0,72	5,43±1,47
	После НАХТ	3,02±0,95	6,36±1,79	3,74±1,37	5,26±1,42	3,93±0,92	5,72±1,78	6,00±2,14	3,88±1,03	3,87±1,07	5,72±1,84
<i>ABCC5</i>	До лечения	3,00±0,91	2,74±0,34	3,19±1,03	2,69±0,32	3,22±0,75	2,56±0,33	3,08±0,61	2,60±0,41	3,60±0,62	2,44±0,42
	После НАХТ	2,53±0,51	3,75±0,71	4,67±1,70	2,98±0,42	4,80±1,23	2,52±0,34²	3,79±0,64	3,09±0,82	4,85±1,36	2,70±0,41
<i>ABCG1</i>	До лечения	2,82±1,03	1,98±0,62	2,61±0,78	2,09±0,65	2,80±1,06	1,82±0,52	2,36±0,93	2,10±0,59	2,44±1,31	2,12±0,50
	После НАХТ	1,39±0,60	1,83±0,48	1,52±0,43	1,76±0,49	1,59±0,57	1,78±0,52	1,53±0,66	1,85±0,44	1,36±0,30	1,86±0,54
<i>ABCG2</i>	До лечения	2,77±0,70	2,50±0,44	1,89±0,56	2,79±0,46	3,17±0,66	2,16±0,43	2,84±0,53	2,35±0,53	2,47±0,71	2,62±0,44
	После НАХТ	3,35±0,84	2,71±0,48	3,61±0,89	2,65±0,47	3,79±0,68	2,27±0,52	4,22±0,78	1,81±0,34⁴	3,80±0,89	2,46±0,45
<i>MVP</i>	До лечения	0,46±0,08	0,36±0,05	0,46±0,07	0,36±0,05	0,37±0,07	0,41±0,06	0,37±0,05	0,41±0,06	0,40±0,07	0,39±0,05
	После НАХТ	0,57±0,13	0,52±0,12	0,63±0,13	0,51±0,12	0,61±0,20	0,48±0,09	0,57±0,18	0,50±0,08	0,76±0,18	0,43±0,11

Примечание: данные по экспрессии представлены в виде средней±ошибка (M±SE); статистическую значимость различий оценивали при помощи критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. 1, p = 0,007; 2, p = 0,027; 3, p = 0,011; 4, p = 0,002; 5, p = 0,045; 6, p = 0,035; 7, p = 0,003 полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

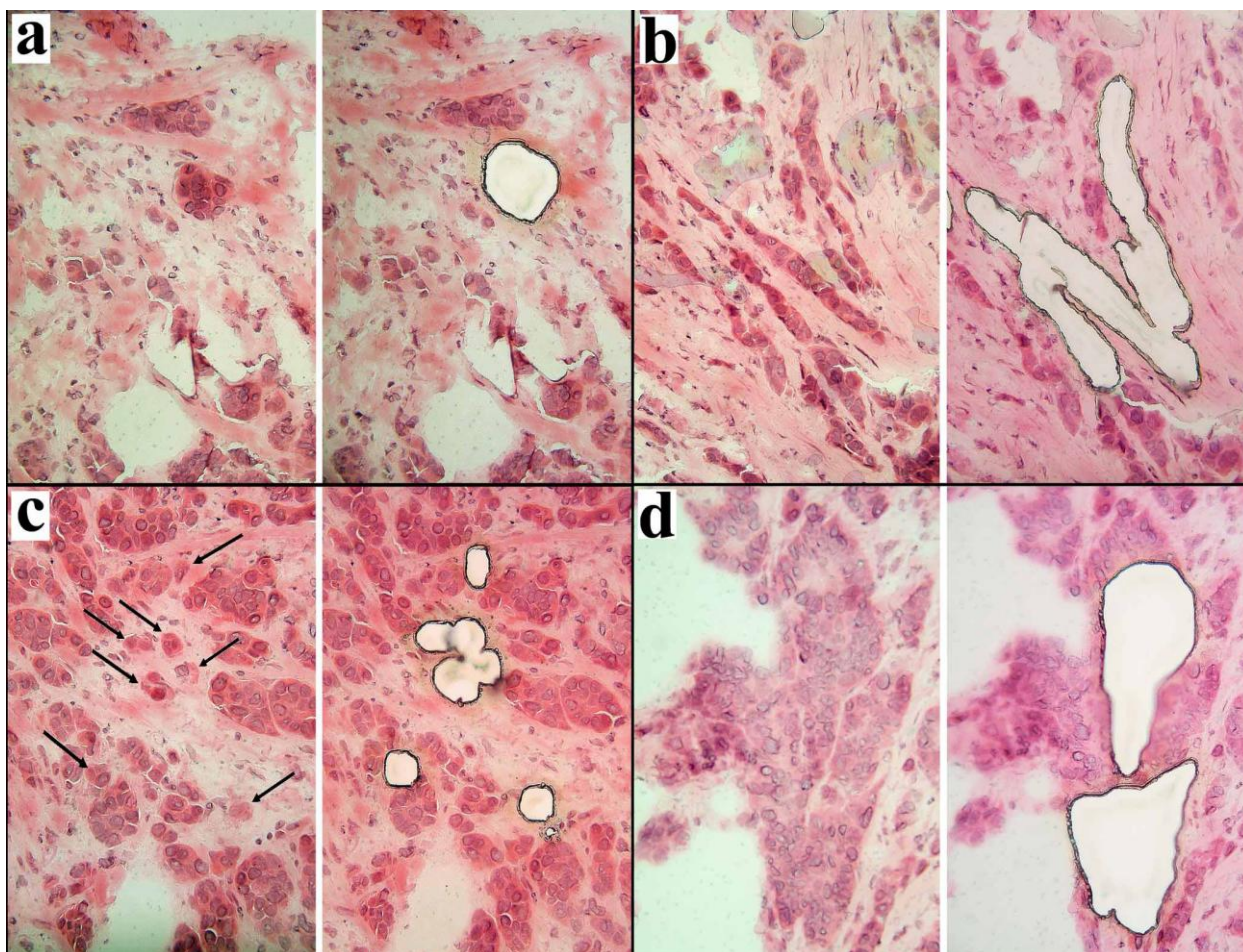


Рисунок 21. - Лазерная микродиссекция различных типов морфологических структур срезов опухоли молочной железы. (а), альвеолярная структура; (b), трабекулярные структуры; (с), дискретные группы опухолевых клеток (отмечены стрелками); (d), солидные структуры. 200X увеличение (по нашей публикации [Denisov E.V., et al., 2014])

У одного пациента была изучена экспрессия ABC-транспортеров непосредственно в морфологических структурах и микроокружении, которые были вырезаны из опухоли при помощи лазерной микродиссекции (рисунок 21). Результаты этого исследования представлены в таблице 22. В альвеолярных структурах наблюдается низкая экспрессия генов ABC, наиболее высокая экспрессия отмечается в дискретных группах опухолевых клеток. Кроме того, микроокружение дискретных групп опухолевых клеток также показало повышенную экспрессию генов ABC-транспортеров. Поскольку было показано, что эффективность НАХТ обусловлена изменением экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе химиотерапии, была изучена связь частоты повышения и снижения экспрессии генов ABC с наличием/отсутствием разных типов морфологических структур.

Таблица 22. – Уровни экспрессии генов ABC в различных типах морфологических структур и их микроокружении

Гены	Альвеолярные		Трабекулярные		Солидные		Дискретные группы	
	Опухолевые клетки	Строма	Опухолевые клетки	Строма	Опухолевые клетки	Строма	Опухолевые клетки	Строма
<i>ABCB1</i>	0	0	0,122	0	0	0	0	0
<i>ABCB3</i>	0,003	0,036	507,34	0	0,072	6,675	0	0
<i>ABCC1</i>	0,299	0	0,001	0	1,303	0	0,126	10,464
<i>ABCC5</i>	0,034	0	0,004	0	6,189	0,003	2,038	21,594
<i>ABCG1</i>	0,002	0	5,351	0,0004	0,340	0	6,386	0
<i>ABCG2</i>	0	0	0,002	0	0	0	301,593	0

В таблице 23 представлены частоты повышения или снижения экспрессии генов ABC-транспортеров в опухолевой ткани молочной железы при проведении НАХТ у пациентов в зависимости от представленности различных морфологических структур.

Таблица 23. – Связь между изменениями экспрессии генов ABC-транспортеров и наличием/отсутствием различных типов морфологических структур в опухоли молочной железы

Морфологические структуры		n1/n2 (%/%)			
		<i>ABCB1</i>	<i>ABCB3</i>	<i>ABCC1</i>	<i>ABCC2</i>
Альвеолярные	нет	7/12 (37/63)	7/12 (37/63)	9/10 (47/53)	8/11 (42/58)
	есть	27/23 (54/46)	15/33 (31/69)	27/23 (54/46)	23/27 (46/54)
Трабекулярные	нет	9/8 (53/47)	5/12 (29/71)	10/7 (59/41)	9/8 (53/47)
	есть	25/27 (48/52)	17/33 (34/66)	26/26 (50/50)	22/30 (42/58)
Тубулярные	нет	15/13 (54/46)	7/19² (27/73)	15/13 (54/46)	13/15 (46/54)
	есть	19/22 (46/54)	22/19² (53/47)	21/20 (51/49)	22/19 (54/46)
Солидные	нет	20/11¹ (65/35)	7/23 (23/77)	17/14 (55/45)	17/14 (55/45)
	есть	14/24¹ (37/63)	15/22 (41/59)	19/19 (50/50)	14/24 (37/63)
Дискретные группы опухолевых клеток	нет	14/8 (64/36)	5/17 (23/77)	10/12 (45/55)	12/10 (54/46)
	есть	20/27 (43/57)	17/28 (38/62)	26/21 (55/45)	19/28 (40/60)

Продолжение таблицы 23

Морфологические структуры		n1/n2 (%/%)			
		<i>ABCC5</i>	<i>ABCG1</i>	<i>ABCG2</i>	<i>MVP</i>
Альвеолярные	нет	10/9 (53/47)	5/14 (26/74)	7/12 (37/63)	6/13 (33/67)
	есть	25/23 (52/48)	21/27 (44/56)	24/26 (48/52)	20/28 (42/58)
Трабекулярные	нет	10/7 (59/41)	7/9 (44/56)	10/7 (59/41)	8/8 (50/50)
	есть	25/25 (50/50)	19/32 (37/63)	21/31 (40/60)	18/33 (35/65)
Тубулярные	нет	13/13 (50/50)	11/16 (41/59)	12/16 (43/57)	11/16 (41/59)
	есть	22/19 (54/46)	15/25 (38/62)	19/22 (46/54)	15/25 (38/62)
Солидные	нет	18/12 (60/40)	11/20 (35/65)	17/14 (55/45)	12/19 (39/61)
	есть	17/20 (46/54)	15/21 (42/58)	14/24 (37/63)	14/22 (39/61)
Дискретные группы опухолевых клеток	нет	13/9 (59/41)	10/11 (48/52)	15/7³ (68/32)	<i>12/9⁴</i> <i>(57/43)</i>
	есть	22/23 (49/51)	16/30 (35/65)	16/31³ (34/66)	<i>14/32⁴</i> <i>(30/70)</i>

Примечание: уровень доверительной вероятности *p* value по двухстороннему критерию Фишера: 1-*p* = 0,030; 2-*p* = 0,044; 3-*p* = 0,010; 4-*p* = 0,057. n1 – число больных с повышением экспрессии гена; n2 – число больных со снижением экспрессии гена; полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Уменьшение в экспрессии *ABCB1* чаще обнаруживалось в опухолях молочной железы с солидными структурами, по сравнению с пациентами, у которых в опухоли солидные структуры отсутствовали (в 63% случаев против 35%, *p*=0,030). При наличии тубулярных структур в опухоли, экспрессия гена *ABCB3* чаще повышалась, в то время как у больных без тубулярных структур частота повышения экспрессии была ниже (53% против 27%, *p* = 0,044). Часто наблюдалось снижение экспрессии гена *ABCG2* и *MVP* у больных с дискретными группами опухолевых клеток, по сравнению с пациентами без дискретных групп клеток (66% против 32%, *p* = 0.010 и 70% против 43%, *p* = 0,057).

Полученные данные показали, что химиорезистентность альвеолярных и трабекулярных структур не связана с активностью ABC-транспортеров. Это подтвердили непосредственные измерения экспрессии генов ABC в альвеолярных и трабекулярных структурах, вырезанных из опухоли при помощи лазерной микродиссекции, и показавшие низкий уровень экспрессии этих генов. Гены ABC-транспортеры экспрессируются в различных клетках стромы опухоли [Linn S.C., et al., 1997, Rafii A., et

al., 2006, Wishart G.C., et al., 1990]. Однако, мы показали отсутствие активности генов ABC в строме альвеолярных и трабекулярных структур. Все это свидетельствует о том, что гены транспортеры лекарственных средств не играют существенной роли в формировании устойчивости альвеолярных и трабекулярных структур к НАХТ, и она должна объясняться другими факторами лекарственной устойчивости. Данные по связи изменения экспрессии ABC-транспортеров при проведении НАХТ с наличием различных типов морфологических структур в опухоли молочной железы достаточно разрозненные и не имеют каких-либо четких закономерностей. Это может свидетельствовать о случайности этих связей, из чего можно сделать вывод о незначительной роли внутриопухолевой морфологической гетерогенности в регуляции изменения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ.

На настоящий момент нам удалось только установить, что одним из факторов, который связан с химиорезистентностью альвеолярных и трабекулярных структур, является ген *ABCB3*. Выявлена четкая связь экспрессии гена *ABCB3* с наличием альвеолярных и трабекулярных структур и ответом на НАХТ.

Альвеолярные структуры имеют сфероидную форму и состоят 5-25 опухолевых клеток. Еще в 70-х прошлого века *in vitro* было показано, что многоклеточные сфероиды, содержащие тысячи клеток, были более устойчивы к радиации и к доксорубину, чем клетки культивируемые в монослое [Ivascu A., et al., 2007, Olive P.L., et al., 1994]. Сфероиды, состоящие из 5-50 клеток были более химиорезистентны, чем одиночные клетки в культуре [Moore N., et al., 2011, Wartenberg M., et al., 2001]. Этот феномен позже назвали "многоклеточной устойчивостью (MCR)" [Kobayashi H., et al., 1993], который был связан с нечувствительностью к почти всем противоопухолевым лекарствам [Desoize V., et al., 2000]. Последующие исследования сообщили, что механизмы MCR связаны с повышением экспрессии ABC-транспортеров, а именно Р-гликопротеина и неспособностью лекарственных средств проникнуть внутрь сфероида. К другим механизмам относятся различия в распределении клеточного цикла в пределах сфероида, наличии гипоксических клеток, торможении апоптоза и увеличенная способность к репарации ДНК (например, через активацию белков теплового шока), и так называемый "эффект контакта" [Ciocca D.R., et al., 2013, Desoize V., et al., 2000, Ivascu A., et al., 2007, Olive P.L., et al., 1994, Wartenberg M., et al., 2001].

Интересно отметить, что сфероиды опухоли (микроэмболы) были ранее обнаружены в периферической крови пациентов с раком легких [Hou J.M., et al., 2011, Stott S.L., et al., 2010, Yu M., et al., 2011], раком яичников [Ahmed N., et al., 2007], раком простаты [Brandt V., et al., 1996, Stott S.L., et al., 2010], почки [Kats-Ugurflu G., et al., 2009], колоректальным

раком [Molnar B., et al., 2001, Murray N.P., et al., 2012], и опухолью молочной железы [Greene B.T., et al., 2012]. По сравнению с одиночными циркулирующими опухолевыми клетками у таких конгломератов опухоли была показана супрессия аноикиса и апоптоза и очень высокий метастатический потенциал [Hou J.M., et al., 2012, Yu M., et al., 2011].

Таким образом, внутриопухолевая морфологическая гетерогенность не оказывает существенного влияния на изменение экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Опухоли с наличием/отсутствием разных типов морфологических структур существенным образом не различаются по экспрессии основных генов ABC-транспортеров. В этой связи поиск механизмов регуляции их экспрессии будет продолжен на генетическом и клональном уровнях.

4.4 Метилирование промоторов генов ABC-транспортеров и их экспрессия в процессе НАХТ

Метилирование промоторных регионов генов является одним из основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов [Jones P.A., 2012]. В опухоли молочной железы уже в ранних стадиях онкогенеза наблюдается общее гипометилирование генома, которое способствует малигнизации процесса [Ehrlich M., 2002]. Наблюдается также и гиперметилирование генов, вовлеченных в арест клеточного цикла и апоптоз [Laird P.W., 2005, Widschwendter M., et al., 2002]. Что касается генов ABC-транспортеров, то опухоли оказывается «выгодной» их гипометилирование и высокая активность экспрессии генов ABC. В этой связи, очень часто наблюдается низкий уровень метилирования промоторных регионов этих генов в опухолевой ткани [Sharma G., et al., 2010]. В исследовании [Chekhun V.F., et al., 2006] было показано гипометилирование области промотора *ABCB1* и *MGMT* генов в MCF-7/R – линии клеток резистентных к доксорубину. Р-гликопротеин сверхэкспрессируется в клетках с фенотипом МЛЮ KB/VJ300 и KB-C1, при этом промотор *ABCB1* оказался гипометилирован [Kusaba H., et al., 1999]. Несмотря на то, что гипометилирование промоторных регионов генов ABC-транспортеров является достаточно известным процессом, участвующим в регуляции экспрессии генов ABC, исследования метилирования генов ABC продолжаются, а клинических работ, особенно на РМЖ, мало. Мы предположили, что снижение экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы, наблюдаемое нами в процессе НАХТ, обусловлено гиперметилированием промоторных областей транспортеров лекарственных средств.

Была исследована связь уровня метилирования промоторной области трех генов *MVP*, *ABCG2* и *ABCB1* непосредственно в опухолевой ткани молочной железы до лечения и уровня экспрессии этих генов до лечения и после НАХТ. Используя базу данных TRED – Transcriptional Regulatory Element Database (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=searchPromForm>), были найдены нуклеотидные последовательности промоторов этих трех генов (красным шрифтом с подчеркиванием выделены сайты рестриктаз Hspa I и Hpa II, полужирным шрифтом выделены праймеры).

Промоторный регион гена *ABCB1*:

CCCTACCTCGCGCTCCTTGGAA**CGGCCACCAAGA****CGTGAAATTTTGGGAAGAAGAT**
ACTC**CGACTTTAGTGGAAAGACCTAAAGGAAA****CGAACAGCGGCCTCTGCTTCTTTGA**
GCTTGGAAAGAGC**CGCTACTCGAATGAGCTCAGGCTTCTGTGGCAAAGAGAG****CGAA**
G**CGGCTGTGCTCAGCCCA****CGCCCGGCGCTGTTCTGCCCAGCCAATCAGCCTCACC**
ACAGATGACTGCTC**CCGGC****CCGGATTGACTGAATGCTG** ампликон 263 bp

Промоторный регион для гена ABCB1 найденный в базе TRED совпадает с последовательностью промотора в статье [Raguz S., et al., 2008].

Промоторный регион гена MVP:

AGAAGCAGC CCGGAGGATAA AATGAGAACCAGCTGCACA **CG**GGCCCTTTAACTCC
CAAGCCCCACCCCTGGGCTTGGCCTGCCTTGCCCTG **CCGG**GAAGTGATCCCCAAGGC
AGGGTGAGAGTTCCCCATCTGAGG **CG**TTTGTTCAGCTACCTGCACTTCTAGATGTG
AGTACATTGTA TAGCCCCCAAACCCCAAATCAGGGGCAGATCTTTGTATCCCTTG
AGGCTCTCTTTAGTCCTGTCTTGCTTTGAAGGGCCTTGCTTCTGCTGGGGCAGGGAA
AACATGTCTGAATCAGAGTGGGGAAGGAGGATGGGTGGTGGCTTTGCTTTTGGAGG
TTTCACTTTCCAATAGTTGGGAGTCTTCTGGGTTTTGAAGTAAAG **GCAGATTAACAC**
CAACA CCGG ампликон 405 bp

Промоторный участок гена ABCG2:

CGC CCGG AACSTTTTGAGTGGGCACAGCAC **CG**CAGCC **CGCGCGCG**GCACAACCCC
TTCCCCAACCACAC **CCGGCGCG**CCCGAG **CG**CTCCCCT **CGCGCG** **CGG CCGGCGT**
GGGAGG **CG**CTG **CG**GCTGGAGGTCA **CG**ATGGGAG **CCGG** **CG**GGTGGCC **CG**CCTGGGGA
GAC **CCGG**ACATCCAGGGGAC **CG**AGCTCAGGCAG **CG**CTGACA **CG**AACTTCCTAAGC
CGGCTT **CG**GGCTGTGGAC **CG**CCAGAGCTGAA **CG**CAGTGGCCCCTCCCAG **CG**CC **CC**
GGGTTTCCCAGGT **CG**GGGTT **CCCG**GG **CG**GGGGTGAGG **CG**TGGCCC **CG**ACTG **CCG**
GGC CCGGATAAG **CG**CCCTGCGAC **CCGG**CTGAAAGC ампликон 365 bp

В качестве маркера внутреннего контроля прохождения ПЦР был выбран короткий 80 bp фрагмент гена MTHFR не содержащий сайты рестрикции

GTGTCAGCCTCAAAGAAAAGCTG **CG**TGATGATGAAAT **CG**GCTCC **CG**CAGACACCT
TCTCCTTCAAGTGCTTCAGGTCAGC

На рисунке 22 показан уровень метилирования промоторных регионов генов ABCB1, MVP и ABCG2 в опухоли молочной железы до лечения отдельных больных и уровень экспрессии этих генов в опухоли до лечения и после НАХТ. В результате исследования установлено, что при гипометилирование промоторных регионов всех изученных генов (на рисунке 22 больная Л1) сочетается с их высокой экспрессией до лечения и повышением экспрессии в процессе НАХТ. Помимо гипометилирования промоторов генов ABC, которое хорошо описано в литературе [Raguz S., et al., 2008, Sharma G., et al., 2010], наблюдается гиперметилирование промоторных областей изученных генов. На рисунке 22 у больной К1 в опухоли до лечения установлено гиперметилирование промоторов генов MVP, ABCG2 и ABCB1, которое сочетается с низкой экспрессией этих генов в опухоли до лечения и повышением экспрессии в процессе НАХТ во всех случаях.

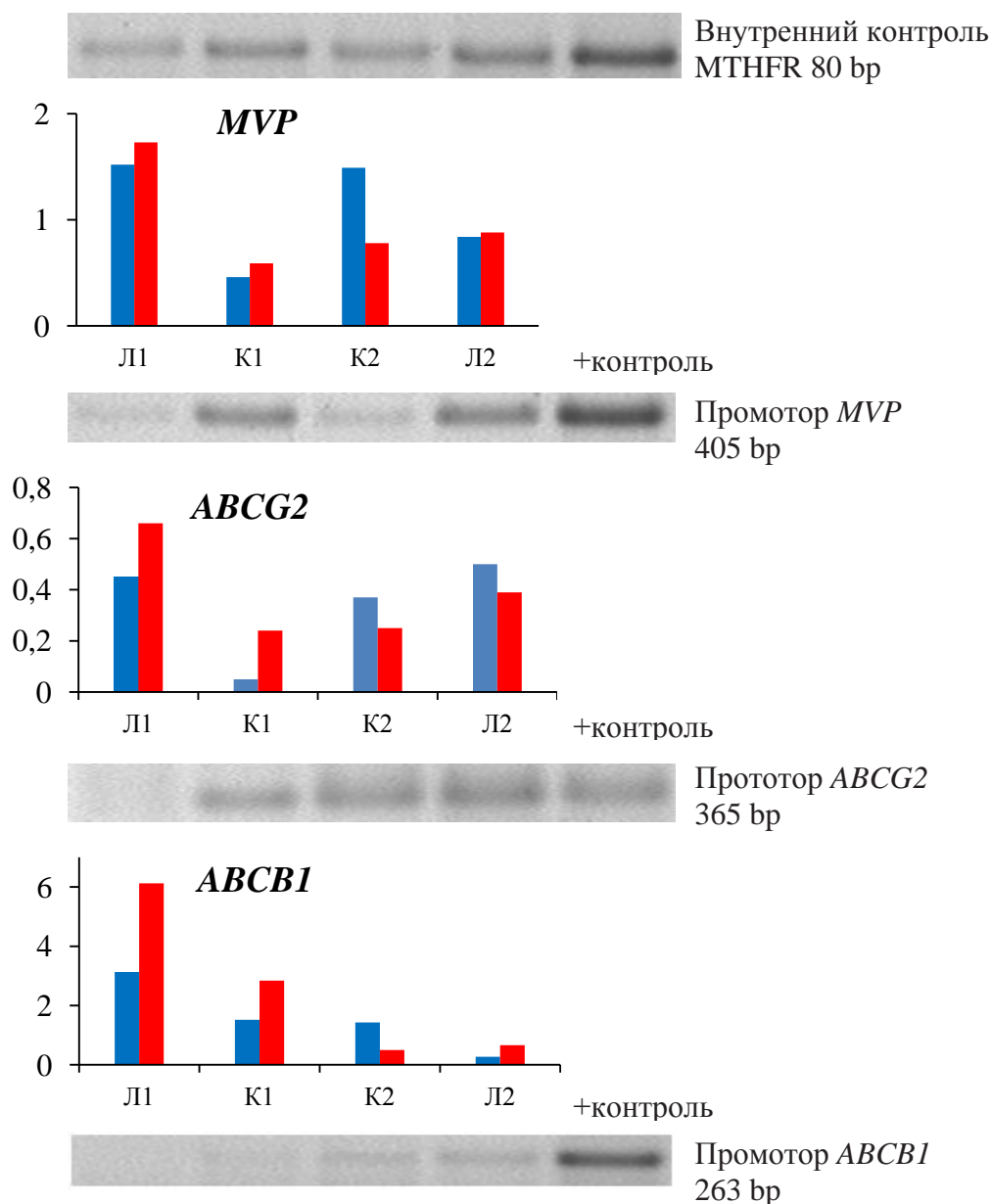


Рисунок 22 – Уровень экспрессии генов *MVP*, *ABCG2* и *ABCB1* в опухоли до лечения и после НАХТ и метилирование их промоторов в опухоли до лечения.

Примечание: На гистограммах представлен уровень экспрессии генов в опухоли больных Л1, К1, К2 и Л2 до лечения (синие столбики) и после НАХТ (красные столбики), который определялся при помощи qPCR (по оси ординат – условные единица). Метилирование промоторов генов оценивалось при помощи метил-чувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР) при использовании смеси метилчувствительных рестриктаз *HpaII* (C↓CGG) и *HspaI* (CGC↓G) (Сибэнзим, Россия). *MspI* (Fermentas, Thermo Scientific) использовали на первом этапе в качестве контроля наличия CpG островков в участке амплификации). Результаты МЧ-ПЦР представлены в виде электрофореграммы для соответствующих больных. Отсутствие специфического бенда (или слабая его выраженность) свидетельствует о гипометилировании промотора. В качестве положительного контроля (+контроль) использовалась геномная ДНК из крови, не подвергавшаяся рестрикции. В качестве внутреннего контроля эффективности МЧ-ПЦР использовали участок гена *MTHFR* – 80 bp (подобран экспериментально из 10 возможных кандидатов) без сайтов рестрикции *HpaII* (C↓CGG), *HspaI* (CGC↓G) и *MspI*.

У больной К2 гиперметилирование промоторов генов *ABCG2* и *ABCB1* также сочетается с низкой экспрессией до лечения, но отмечается снижение экспрессии этих генов в процессе НАХТ. У больной Л2 несмотря на то, что отмечается гиперметилирование промоторов всех трех генов, изменение экспрессии генов МЛЮ в процессе НАХТ разнонаправленное, повышение при метилировании промотора *ABCB1* и *MVP* и снижение при метилировании промотора *ABCG2*. Для подтверждения данных метилчувствительной ПЦР было проведено дополнительное исследование метилирования промотора *ABCB1* в опухоли молочной железы до лечения при помощи бисульфитной конверсии и последующего секвенирования и также связь с уровнем экспрессии данного гена до лечения и после химиотерапии. Установлено метилирование промотора гена *ABCB1*, количество метилированных CG пар было неодинаковым и колебалось в пределах от 1 до 6 (рисунок 23). Кроме того, в двух случаях РМЖ отмечено метилирование цитозина в составе повторов CC и CCCC. Ранее данный феномен был установлен при других ЗНО [Brooks A.R., et al., 2004, Kouidou S., et al., 2005, Kouidou S., et al., 2006]. Метилирование, не затрагивающее CG пары или CpG островки, было названо не CpG-метилированием и, вероятно, является важнейшим событием в злокачественной трансформации, в частности в повышении частоты мутаций через спонтанную дезаминацию метилированных цитозинов [Kouidou S., et al., 2005, Kouidou S., et al., 2006]. Подтвердилось, что частота метилирования, в частности количество метилированных CG пар в промоторной области гена *ABCB1*, находится в тесной связи с уровнем экспрессии данного гена в опухоли до лечения и, по сути, определяет предсуществующую МЛЮ. Наличие от 1 до 2 метилированных цитозинов в составе CG пар было сочетается с высокой экспрессией *ABCB1* до лечения (пример больные С2, В3 и Ч1 на рисунке 23) и повышением экспрессии в процессе НАХТ (больные С2 и В3). Напротив, одновременное присутствие более 2 метилированных CG пар приводило к снижению экспрессии гена *ABCB1* (больная П2 на рисунке 21), но при воздействии на опухоль химиопрепаратов у данной больной наблюдалось повышение экспрессии *ABCB1*. Интересно отметить, что высокая экспрессия *ABCB1* была в одном случае РМЖ с наличием 4 метилированных CG пар, что не укладывалось в общую закономерность. Однако проведенный детальный анализ нуклеотидной последовательности данного гена в этом случае показал наличие точечной мутации G>C, вероятно провоцирующей повышенную амплификацию *ABCB1*.

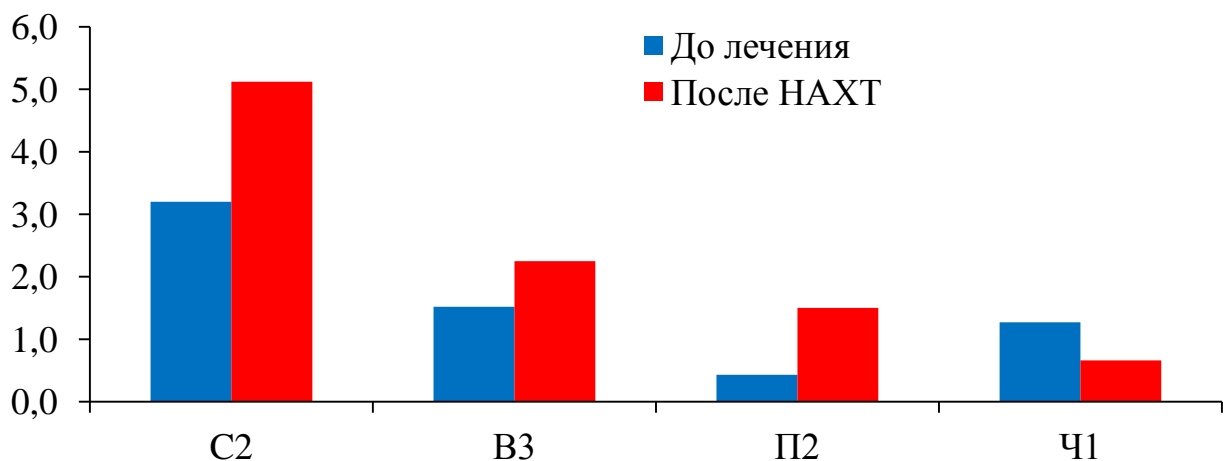
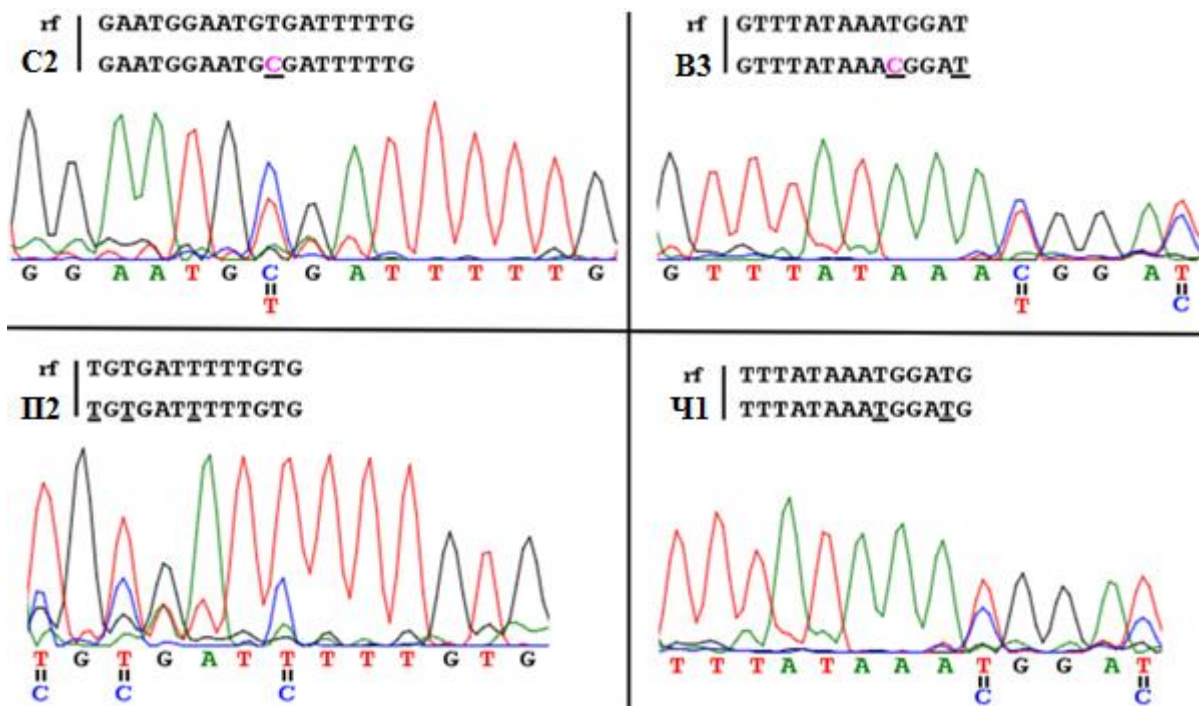


Рисунок 23 – Хроматограмма анализа метилирования промоторного региона гена *ABCB1* в опухолевой ткани больных РМЖ. Показаны Rf как контрольная последовательность; C2, B3, П2 и Ч1 как примеры исследуемых образцов. Двойные пики на хроматограмме и обозначения T = C или C = T свидетельствуют о наличии в общем пуле опухолевой ДНК образцов с метилированными CG парами. На гистограмме представлена экспрессия гена *ABCB1* до лечения (синие столбики) и после НАХТ (красные столбики) у больных C2, B3, П2 и Ч1.

Анализ результатов исследования метилирования промоторов генов ABC двумя независимыми методами позволил выявить гиперметилирование промоторных регионов генов ABC-транспортеров, которое, казалось бы, не «выгодно» опухоли, но, тем не менее описано в литературе. Промотор *ABCB1* гиперметилирован в 28% колоректальных опухолей, при этом данный тип эпигенетической регуляции сочетался с чувствительностью к химиотерапии [Shannon B.A., et al., 2001]. Экспрессия Pgp была обратно пропорциональна метилированию CpG сайтов на промоторе *ABCB1* у больных раком мочевого пузыря [Tada Y., et al., 2000]. Экспрессия *ABCB1* была связана с

метилированием промотора в бронхоальвеолярном эпителии при раке легкого [Gao P., et al., 2009]. Было обнаружено, что клетки лейкемии, не экспрессирующие *ABCBI*, имеют метилированный *ABCBI* [El-Osta A., et al., 2001, El-Osta A., et al., 2002]. Недавно было продемонстрировано, что метилирование промоторной области гена *ABCBI* ассоциировано с лучшей общей выживаемостью больных РМЖ. Авторы заключили, что механизм этого явления, вероятно, заключался в инактивации экспрессии *ABCBI* и пролонгированном действии химиопрепарата (доксорубин) в опухолевых клетках молочной железы. Отсутствие метилированных CG пар коррелировало с прогрессией РМЖ при назначении доксорубина [Dejeux E., et al., 2010]. Кроме того, данная группа исследователей установила, что уровень метилирования гена *ABCBI* был выше в опухолях молочной железы с наличием экспрессии рецепторов к эстрогенам и ниже в опухолевых клетках с наличием мутаций в гене *TP53* [Muggerud A.A., et al., 2010]. Несмотря на хорошую связь уровня метилирования промоторов генов МЛУ с их экспрессией, наши данные позволили достаточно четко установить, что гиперметилирование промоторов в опухоли до лечения не оказывает существенного влияния на изменение экспрессии генов ABC в процессе проведения НАХТ, а по существу определяет только исходный уровень экспрессии генов ABC-транспортеров в опухоли (предсуществующую МЛУ). Одним из объяснений этому является известный феномен снижения метилирования генов ABC в процессе химиотерапии. Есть много данных, демонстрирующих, что химиотерапевтические лекарственные средства уменьшают метилирование ДНК и ингибируют активность диацетилирования гистонов [Hanafy S., et al., 2011, Samlowski W.E., et al., 2005, Wilting R.H., et al., 2012], которые могут сделать промоторы генов ABC доступными для активации транскрипции. Различные механизмы индукции гипометилирования ДНК химиотерапевтическими препаратами были описаны в недавнем обзоре [Wilting R.H., et al., 2012]. Однако пока не установлены точные маркеры, которые позволили бы прогнозировать снижение метилирования промоторов гена ABC-транспортера у больного в процессе проведения химиотерапии в случае их гиперметилирования. Это может быть предметом будущих исследований.

Таким образом, уровень метилирования промоторных областей генов ABC коррелирует с исходным уровнем экспрессии этих генов в опухоли молочной железы и определяет предсуществующую МЛУ, но не оказывает существенного влияния на изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ.

4.5 Ген-супрессор опухолевого роста *TP53* и экспрессия ABC-транспортеров в опухоли молочной железы

Ген *TP53* является одним из наиболее известных генов-супрессоров опухолевого роста. Он играет центральную роль в поддержании стабильности генома и предотвращении репликации поврежденной ДНК, при этом белок p53 временно блокирует процесс деления клетки и запускает репарацию ДНК или апоптоз, если эти повреждения невозможно устранить [Чумаков П.М., 2007]. Важно подчеркнуть, что *TP53*-зависимый апоптоз элиминирует из организма не только поврежденные клетки, но и клетки, в которых наблюдается нерегулируемая стимуляция пролиферации, вызываемая, например, активацией онкогенов [Soussi T., 2005, Soussi T., et al., 2007]. *TP53* является фактором активации большого количества генов, которые участвуют в ингибции клеточного цикла, активации апоптоза и угнетении ангиогенеза опухоли и мн. др., всего более 100 генов [Чумаков П.М., 2007].

Ген *TP53* регулирует экспрессию множества генов, среди которых и основной ген множественной лекарственной устойчивости – *ABCB1*. Белок p53 дикого типа непосредственно связывается с регионом проксимального промотора гена *ABCB1* и ингибирует транскрипцию *ABCB1* [Johnson R.A., et al., 2001, Scotto K.W., 2003, Thottassery J.V., et al., 1997]. Кроме того, при изучении лекарственной устойчивости клеточных линий рабдомиосаркомы и нейробластомы было обнаружено, что p53 является мощным ингибитором функции Р-гликопротеина и *ABCC1* [Chen K.G., et al., 2012, Goldstein L., 1996]. В системе *in vitro* было четко показано, что мутантный p53 стимулирует экспрессию *ABCB1* и выступает в качестве онкогена [SamPATH J., et al., 2001].

В настоящей работе была изучена связь соматических мутаций гена *TP53* с эффективностью НАХТ, нормальной генетической вариабельности гена *TP53* с эффективностью НАХТ и экспрессией ABC-транспортеров, а также aberrаций локуса *TP53* в ДНК опухоли с эффективностью НАХТ и изменением экспрессии ABC-транспортеров.

Было установлено, что у 8/13 (62%) больных с соматическими мутациями в различных экзонах и интронах гена *TP53* в опухоли эффект НАХТ отсутствовал (наблюдалась стабилизация или прогрессирование) (таблица 24), в то время как в общей группе эффект НАХТ отмечается у 60% больных. Таким образом, наличие соматических мутаций гена *TP53* в опухоли сопряжено с отсутствием ответа на НАХТ, что может быть связано со стимуляцией экспрессии гена *ABCB1*, как это было установлено в работе [SamPATH J., et al., 2001] и других ABC-транспортеров.

Таблица 24. – Связь соматических мутаций гена *TP53* и эффективности НАХТ

Интрон/ экзон	Изменение последовательности	Изменение аминокислот	Эффект НАХТ
In 4, Ex 5	c.376-57A > C; c.557A > G	- p.Asp186Gly	Частичная регрессия
In 6	c.673-20G > C	-	Стабилизация
In 8	c.919+26_c.919+27ins1	-	Стабилизация
Ex 5	c.390C > T	p.Leu130Leu	Частичная регрессия
Ex 5	c.488A > G	p.Tyr163Cys	Стабилизация
Ex 5	c.501G > C	p.Gln167His	Частичная регрессия
Ex 5	c.538G > A	p.Glu180Lys	Стабилизация
Ex 5, Ex 7	c.541C > T, c.697C > T	p.G181Cys, p.His233Tyr	Частичная регрессия
Ex 7	c.697_699del3	-	Прогрессирование
Ex 7, Ex 7	c.743G > A, c.762C > T	p.G248Gln, p.Ile254Ile	Стабилизация
Ex 7	c.762C > T	p.Ile254Ile	Частичная регрессия
Ex 8	c.856G > A	p.Glu286Lys	Прогрессирование
Ex 8	c.856G > A	p.Glu286Lys	Прогрессирование

Примечание: таблица приведена по нашей публикации [Denisov E.V., et al., 2011] с изменениями.

На следующем этапе была определена связь трех SNP гена *TP53*: rs1042522 (экзонный), rs12602273 (интронный) и rs8073498 (интронный) с эффективностью НАХТ и экспрессией АВС-транспортеров. Полиморфизм rs1042522 – это один из самых известных полиморфных локусов гена *TP53*. *Arg/Pro* полиморфизм локализован в пролин-богатом участке (65-97 bp) белка p53, где *p53Pro* составляет 1 из 5 повторов *PXXP*, ответственных за супрессорную ростовую и апоптотическую активность [Langerød A., et al., 2002]. Обе формы не отличаются друг от друга по способности связывать специфические последовательности ДНК, но отличаются в способности связывать компоненты транскрипционной машины, активировать транскрипцию, запускать программу апоптоза, физически взаимодействовать с белком p73, а также репрессировать трансформацию первичных клеток. Для *Arg* характерен преимущественный запуск апоптоза [Thomas M., et al., 1999]. Белок p53Pro имеет лучший репарационный потенциал. Как показали наши исследования, *Pro/Pro* генотип более эффективен при репарации ДНК (отмечается уменьшение уровня хромосомных aberrации лимфоцитов крови) у больных ЗНО, возникшими на фоне низкоинтенсивного облучения [Litviakov N.V., et al., 2010].

Мета-анализ 2010 года на 26 041 случаях рака молочной железы и контрольной выборке численностью 29 679 в общей группе установил снижение риска развития РМЖ у гетерозигот по сравнению с носителями аргининового генотипа OR 95% CI=0,91(0,83-1,00). В стратифицированных исследованиях меньший риск был установлен у европейцев (*Arg/Pro* против *Arg/Arg* OR 95% CI=0,89(0,80-0,99); *Pro/Pro+Arg/Pro* против *Arg/Arg* OR 95% CI=0,88(0,80-0,98) [Zhang Z., et al., 2010]. Были проведены и мета-анализы связи

rs1042522 полиморфизма с риском развития других локализаций: колоректального рака [Dahabreh I.J., et al., 2010], диффузного рака желудка, интестинального рака желудка [Gao L., et al., 2009], рака мочевого пузыря [Jiang D.K., et al., 2010], рака кожи [Jiang D.K., et al., 2011], рака легкого [Dai S., et al., 2009, Yan L., et al., 2009], рака матки [Jiang D.K., et al., 2010].

Два других полиморфных локуса *TP53* rs8073498 и rs12602273 менее известны. *TP53Ex11+2042T>G* rs8073498 предположительно, связан с регуляцией транскрипции гена *TP53* и у носителей мутантного генотипа rs8073498 ниже экспрессия *TP53* (F-SNP <http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>). Известно, что *TP53Ex11+2042T>G* rs8073498 не ассоциирован с риском развития рака яичников у белого населения Испании [Schildkraut J.M., et al., 2009] и базальноклеточной карциномы [Rizzato C., et al., 2011]. Мажорный *TT* генотип rs8073498 предрасполагает к развитию ЗНО на фоне хронического радиационного воздействия, а гетерозиготный генотип является защитным [Литвяков Н.В., и др., 2009].

Полиморфизм rs12602273 сцеплен с SNP rs12951053 и связан с выживаемостью пациентов с идиопатическим легочным фиброзом, у носителей минорного аллеля выживаемость была в 2 раза меньше, чем у носителей мажорного аллеля [Korthagen N., et al., 2011, Korthagen N.M., et al., 2012, Steele M.P., et al., 2013]. Этот полиморфизм не показал связи с риском развития и базальноклеточной карциномы [Rizzato C., et al., 2011] и риском развития рака мочевого пузыря [Lin H.-Y., et al., 2013]. По данным сайта (F-SNP <http://compbio.cs.queensu.ca/F-SNP/>) rs12602273 предположительно связан с регуляцией транскрипции гена *TP53*.

Ранее нами было установлено, что у больных РМЖ, носителей *Arg/Arg* или *Arg/0* генотипов *TP53+119C>G Arg72Pro* rs1042522 (последний генотип образуется в результате утраты *Pro* аллеля гетерозиготного локуса), определяемых в опухолевой ДНК, достоверно повышена частота соматических мутаций ДНК-связывающих (5, 7 и 8) экзонов *TP53* и хромосомных aberrаций [Denisov E.V., et al., 2009, Denisov E.V., et al., 2011, Litviakov N.V., et al., 2010]. В этом случае, у носителей *Pro/Pro* генотипа по идее, должен реже экспрессироваться мутантный p53 и вероятность ингибирования экспрессии ABC-транспортеров должна быть выше. В таблице 25 представлены результаты, показывающие связь генотипов rs1042522 *TP53* с эффективностью НАХТ. Эти данные противоречат найденной ранее ассоциации *Arg/Arg* генотипа с соматическими мутациями *TP53*. Носители дикого *Arg/Arg* генотипа хорошо отвечали на НАХТ, по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа (общая модель наследования). В доминантной модели наследования (*Arg/Arg* против *Arg/Pro+Pro/Pro*) уровень доверительной вероятности возрастал до $p = 0,02$, OR (95%CI) = 3,28(1,19-9,03).

Таблица 25. – Связь SNP гена *TP53* с эффективностью НАХТ

SNP	Генотип	Нет ответа на НАХТ	Объективный ответ на НАХТ	OR(95% CI)	p value
rs1042522	<i>Arg/Arg</i>	10 (27)	27 (73)	0,31 (0,11-0,84)	0,048
	<i>Arg/Pro</i>	15 (58)	11 (42)	3,41 (1,22-9,51)	
	<i>Pro/Pro</i>	2 (40)	3 (60)	1,01 (0,16-6,50)	
rs8073498	T/T	12 (48)	13 (52)	1,68 (0,57-4,92)	0,630
	T/G	8 (36)	14 (64)	0,72 (0,24-2,18)	
	G/G	3 (33)	6 (77)	0,68 (0,15-3,03)	
rs12602273	C/C	20 (36)	36 (64)	0,37 (0,09-1,47)	0,352
	C/G	6 (60)	4 (40)	2,70 (0,68-10,71)	
	G/G	0 (50)	0 (50)	1,53 (0,03-79,41)	

Примечание: уровень доверительной вероятности p value по двухстороннему критерию Фишера с использованием калькулятора http://gen-exp.ru/calculator_or.php, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Наши результаты подтверждаются исследованиями китайских и японских ученых, которые показали, что для больных РМЖ с *Pro/Pro* генотипом характерна меньшая чувствительность к антрациклин-содержащим схемам неоадьювантной химиотерапии и меньшая безрецидивная выживаемость при проведении адьювантной химиотерапии [Тоуама Т., et al., 2007, Ху Y., et al., 2005]. Данные по связи статуса гена *TP53* и ответа на терапию при РМЖ собраны в обзоре [Varna M., et al., 2011]. Кроме того, высокая эффективность НАХТ у носителей *Arg/Arg* генотипа сочеталась с низкой экспрессией (снижением) генов *ABCC1* и *ABCC5* по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа в операционных образцах опухоли после НАХТ (таблица 26). В таблице 26 показан уровень экспрессии АВС-транспортеров у носителей генотипов rs1042522.

По двум другим изучаемым полиморфизмам *TP53* не установлено статистически значимых различий по уровню экспрессии АВС-транспортеров в опухоли до лечения и после НАХТ у носителей разных генотипов (данные не представлены).

Была оценена частота снижения или повышения экспрессии АВС-транспортеров в процессе НАХТ у носителей разных генотипов *TP53+119C>G Arg72Pro* rs1042522 (таблица 27). У носителей *Arg/Arg* генотипа статистически значимо чаще снижается экспрессия генов *ABCG2* и *MVP* (в 65% и 73 % случаев, соответственно), чем у носителей гетерозиготного и минорного генотипов. Кроме того, экспрессия генов *ABCB1* и *ABCC1*, (на уровне тенденции, $p<0,1$), также чаще снижается у носителей аргининового генотипа (таблица 27).

Таблица 26. – Уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ у носителей генотипов rs1042522.

Ген	Точка	<i>TP53+119C>G Arg72Pro</i> rs1042522			p value		
		1. <i>Arg/Arg</i>	2. <i>Arg/Pro</i>	3. <i>Pro/Pro</i>	p1-2	p1-3	p2-3
<i>ABCB1</i>	До лечения	4,06±0,99	3,10±0,83	4,65±3,75	0,487	0,771	1,0
	После НАХТ	3,37±0,95	5,53±2,15	1,73±1,27	0,314	0,627	0,452
<i>ABCB3</i>	До лечения	0,67±0,09	1,10±0,24	1,31±0,33	0,065	0,051	0,452
	После НАХТ	0,61±0,14	1,13±0,43	1,09±0,28	0,210	0,056	0,217
<i>ABCC1</i>	До лечения	0,90±0,14	1,65±0,49	2,17±1,48	0,099	0,382	0,747
	После НАХТ	0,80±0,16	1,81±0,44	3,82±2,42	0,018	0,099	0,788
<i>ABCC2</i>	До лечения	2,37±0,51	3,59±1,32	3,64±2,59	0,335	0,801	0,707
	После НАХТ	2,56±0,69	4,20±2,02	3,09±2,19	0,384	0,322	0,707
<i>ABCC5</i>	До лечения	2,38±0,55	2,70±0,45	0,94±0,28	0,665	0,449	0,086
	После НАХТ	1,86±0,37	3,64±0,71	1,87±0,79	0,020	0,720	0,283
<i>ABCG1</i>	До лечения	1,68±0,50	3,71±1,49	1,23±0,62	0,146	0,954	0,591
	После НАХТ	1,29±0,36	2,16±0,62	0,76±0,37	0,201	0,907	0,485
<i>ABCG2</i>	До лечения	2,34±0,48	1,89±0,53	2,53±1,76	0,537	0,954	0,957
	После НАХТ	2,18±0,51	3,21±0,89	1,32±0,78	0,289	0,861	0,519
<i>MVP</i>	До лечения	0,55±0,16	0,45±0,08	0,49±0,20	0,631	0,846	0,747
	После НАХТ	0,53±0,20	0,72±0,21	0,42±0,17	0,513	0,712	0,629

Примечание: уровень доверительной вероятности p1-2, p1-3 и p2-3 по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни; данные по уровню экспрессии представлены в виде средней±ошибка средней (M±m), полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Таким образом, *Arg/Arg* генотип rs1042522 связан с регуляцией экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в процессе НАХТ. У носителей этого генотипа снижена экспрессия генов *ABCC1* и *ABCC5* в образцах после НАХТ и чаще снижается экспрессия генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP* в процессе НАХТ, чем у носителей гетерозиготного и минорного генотипов.

Ранее нами было показано, что *Arg/Arg* генотип ассоциирован с повышенной частотой ЛОН участков этого гена [Denisov E.V., et al., 2011]. Очень часто причиной потери гетерозиготности является делеция участков гена [Huang N., et al., 2012, Xu Y., et al., 2012]. В этой связи мы посмотрели связан ли полиморфизм rs1042522 с делецией 17p13.1 своего локуса.

У носителей *Arg/Arg* генотипа *TP53+119C>G Arg72Pro* rs1042522 статистически значимо чаще наблюдается гаплотипическая недостаточность локуса (делеция) гена *TP53* (в 27/41 в 65% случаев), чем у носителей *Arg/Pro+Pro/Pro* генотипов (12/29 в 41% случаев) (рисунок 24). Это соответствует нашим данным о связи *Arg/Arg* генотипа с повышенной частотой хромосомных aberrаций в лимфоцитах крови у облученных индивидов [Litviakov N.V., et al., 2010]

Таблица 27. – Частота изменения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в процессе НАХТ у носителей разных генотипов *TP53+119C>G Arg72Pro rs1042522*

Ген	Изменение экспрессии	<i>TP53+119C>G Arg72Pro rs1042522</i>	
		<i>Arg/Arg</i>	<i>Arg/Pro+ Pro/Pro</i>
<i>ABCB1</i>	Повышение	12 (32%)	17 (55%)
	Снижение	25 (68%)	14 (45%)
p value		0,053	
<i>ABCB3</i>	Повышение	13 (36%)	13 (42%)
	Снижение	23 (64%)	18 (58%)
p value		0,406	
<i>ABCC1</i>	Повышение	15 (41%)	19 (61%)
	Снижение	22 (59%)	12 (39%)
p value		0,071	
<i>ABCC2</i>	Повышение	12 (32%)	15 (48%)
	Снижение	25 (68%)	16 (52%)
p value		0,137	
<i>ABCC5</i>	Повышение	16 (44%)	18 (58%)
	Снижение	20 (56%)	13 (42%)
p value		0,193	
<i>ABCG1</i>	Повышение	13 (35%)	14 (45%)
	Снижение	24 (65%)	17 (55%)
p value		0,277	
<i>ABCG2</i>	Повышение	13 (35%)	18 (58%)
	Снижение	24 (65%)	13 (42%)
p value		0,049	
<i>MVP</i>	Повышение	10 (27%)	16 (52%)
	Снижение	27 (73%)	15 (48%)
p value		0,034	

Примечание: уровень доверительной вероятности p value по одностороннему критерию Фишера <http://vassarstats.net/odds2x2.html>, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия, полужирным курсивом различия на уровне тенденции ($p < 0,1$).

Делеция или гаплотипическая недостаточность локуса 17p13.1 гена *TP53* не влияет на уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли до лечения и после НАХТ (таблица 28). В то же время, практически по всем изученным генам ABC (за исключением *ABCB3* и *ABCC1*) отмечается связь CNA локуса 17p13.1 гена *TP53*. При делеции локуса 17p13.1 статистически значимо (или на уровне тенденции) чаще отмечается снижение экспрессии генов ABC в опухоли молочной железы в процессе НАХТ (таблица 28).

Таким образом, установлено, что делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* связана с *Arg/Arg* генотипом полиморфизма rs1042522. Кроме того при делеции отмечается негативная регуляция экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Учитывая, что белок p53 дикого типа ингибирует транскрипцию *ABCB1* и других генов ABC [Chen K.G., et al., 2012, Goldstein L., 1996, Johnson R.A., et al., 2001, Scotto K.W., 2003, Thottassery J.V., et al., 1997], а делеция локуса гена обуславливает его сниженную экспрессию [Huang N., et

al., 2012, Xu Y., et al., 2012], по идее, делеция локуса *TP53* должна повышать экспрессию ABC-транспортеров, в этом случае, наблюдаемая нами down-регуляция ABC-транспортеров при делеции локуса *TP53*, не укладывается в эту закономерность.

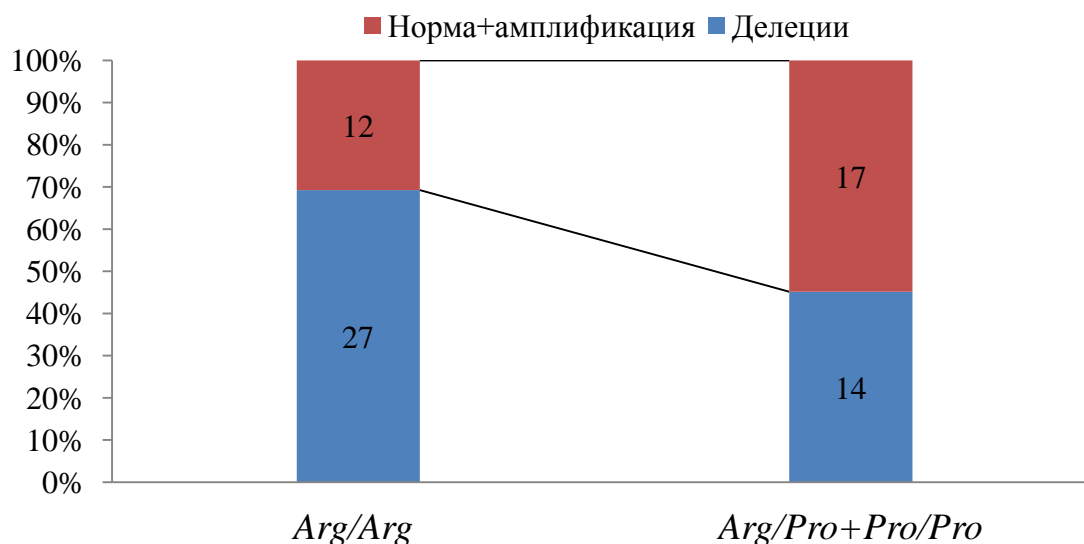


Рисунок 24. – Частота делеций, нормального состояния или амплификаций локуса гена *TP53* в опухолевой ДНК у носителей *Arg/Arg* генотипа *TP53+119C>G Arg72Pro rs1042522* и *Arg/Pro+Pro/Pro*. *p* value по одностороннему критерию Фишера = 0,037

Таблица 28. – Экспрессия ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ при делеции и нормальном состоянии локуса 17p13.1 гена *TP53*

Ген	Точка	Делеция 17p13.1	Норма+амплификация 17p13.1	<i>p</i> value
<i>ABCB1</i>	До лечения	4,20±0,92	3,12±0,98	0,432
	После НАХТ	3,60±0,90	4,72±1,95	0,572
<i>ABCB3</i>	До лечения	0,83±0,10	0,97±0,22	0,534
	После НАХТ	0,74±0,14	0,99±0,39	0,500
<i>ABCC1</i>	До лечения	1,33±0,30	1,21±0,37	0,787
	После НАХТ	1,53±0,42	1,24±0,29	0,601
<i>ABCC2</i>	До лечения	3,06±0,75	2,75±0,99	0,800
	После НАХТ	2,49±0,66	4,21±1,84	0,330
<i>ABCC5</i>	До лечения	2,73±0,53	1,95±0,40	0,265
	После НАХТ	2,26±0,39	2,94±0,65	0,345
<i>ABCG1</i>	До лечения	3,40±1,07	1,11±0,29	0,075
	После НАХТ	2,00±0,50	1,03±0,23	0,123
<i>ABCG2</i>	До лечения	2,31±0,50	2,01±0,47	0,681
	После НАХТ	2,46±0,56	2,57±0,72	0,906
<i>MVP</i>	До лечения	0,44±0,07	0,60±0,20	0,411
	После НАХТ	0,46±0,10	0,77±0,28	0,255

Примечание: уровень доверительной вероятности *p* value по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни.

Учитывая, что была показана стимуляция экспрессии АВС-транспортеров в опухоли мутантным p53 [Chin K.V., et al., 1992, Dittmer D., et al., 1993, Johnson R.A., et al., 2001, Sampath J., et al., 2001], можно предположить, что при делеции локуса *TP53* он всегда мутирован и при гаплотипической недостаточности снижается экспрессия не дикого p53 (ингибирующего АВС-транспортеры) а мутантного p53 (стимулирующего АВС-транспортеры). Такое предположение подразумевает, что при делеции почти всегда должна наблюдаться точковая мутация *TP53*.

Это хорошо сочетается с двухударной моделью Кнудсона, когда один аллель гена-супрессора инактивируется мутацией, а второй аллель инактивируется благодаря делеции [Knudson A.G., 1971], а также с исследованиями, в которых было показано одновременное наличие мутаций и потери гетерозиготности в гене *TP53*, поскольку предполагалось, что одна мутация недостаточна для полной инактивации p53. Сочетание точковой мутации и ЛОН гена *TP53* широко распространенный феномен в человеческих опухолях [Baker S.J., et al., 1990, Nigro J.M., et al., 1989].

Хорошо известно, что точковые мутации *TP53* являются неблагоприятным прогностическим фактором, и выживаемость больных раком молочной железы с мутацией *TP53* значительно снижена [Langerod A., et al., 2007, Petitjean A., et al., 2007]. В случае верности нашего предположения, у больных с делецией локуса 17p13.1 гена *TP53* должна быть значительно снижена безметастатическая выживаемость, поскольку предполагается сочетание делеции с мутацией *TP53*. Однако, как показано на рисунке 25, наблюдается совершенно противоположная картина. У больных с делецией локуса 17p13.1 гена *TP53* 5-ти летняя безметастатическая выживаемость значительно выше, чем у больных с нормальным состоянием локуса 17p13.1 гена *TP53*. Эти данные, в соответствии с высказыванием А.Энштейна («Никаким количеством экспериментов нельзя доказать теорию; но достаточно одного эксперимента, чтобы ее опровергнуть полностью») опровергают наше предположение о сочетании мутации p53 и делеции его локуса.

Исходя из приведенных данных, другим возможным объяснением связи наличия делеции локуса 17p13.1 гена *TP53* и негативной регуляции экспрессии АВС-транспортеров в процессе НАХТ, может быть мутация *TP53* при нормальном состоянии локуса 17p13.1, в то время как при делеции аллеля, второй аллель сохраняется в диком виде. Большое повышение экспрессии мутантного p53 (делеции его локуса нет) под действием химиопрепаратов (при мутации p53 часто отмечается его повышенная экспрессия [Langerod A., et al., 2007]) стимулирует экспрессию АВС-транспортеров в процессе НАХТ, напротив, даже слабое повышение экспрессии p53 дикого типа за счет оставшегося не делетированного аллеля под действием химиотерапии, приводит к

ингибированию экспрессии ABC-транспортеров (отмечено в таблице 29). Нельзя также списывать со счетов роль опухолевого микроокружения в этих процессах. В частности, было показано, что стромальные клетки опухоли молочной железы способны экспрессировать гамма изоформу p53 (одну из 9 изоформ p53) и нивелировать действие мутантного p53 в опухоли. У больных, экспрессирующих наряду с мутантным p53 гамма изоформу p53, выживаемость больных значительно выше, чем у больных, экспрессирующих только мутантный p53 [Bourdon J.-C., et al., 2011].

Таблица 29. – Частота изменения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в процессе НАХТ при делеции и нормальном состоянии локуса 17p13.1 гена TP53

Ген	Изменение экспрессии	Делеция 17p13.1	Норма+амплификация 17p13.1
<i>ABCB1</i>	Повышение	13 (33%)	16 (55%)
	Снижение	26 (67%)	13 (45%)
p-value		0,060	
<i>ABCB3</i>	Повышение	13 (34%)	13 (45%)
	Снижение	25 (66%)	16 (55%)
p-value		0,263	
<i>ABCC1</i>	Повышение	18 (46%)	16 (55%)
	Снижение	21 (54%)	13 (45%)
p-value		0,312	
<i>ABCC2</i>	Повышение	12 (31%)	15 (52%)
	Снижение	27 (69%)	14 (48%)
p-value		0,067	
<i>ABCC5</i>	Повышение	16 (42%)	18 (62%)
	Снижение	22 (58%)	11 (38%)
p-value		0,084	
<i>ABCG1</i>	Повышение	10 (26%)	17 (59%)
	Снижение	29 (74%)	12 (41%)
p-value		0,006	
<i>ABCG2</i>	Повышение	14 (36%)	17 (59%)
	Снижение	25 (64%)	12 (41%)
p-value		0,053	
<i>MVP</i>	Повышение	11 (28%)	15 (52%)
	Снижение	28 (72%)	14 (48%)
p-value		0,043	

Примечание: уровень доверительной вероятности p-value по критерию Фишера, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия, полужирным курсивом различия на уровне тенденции ($p < 0,1$).

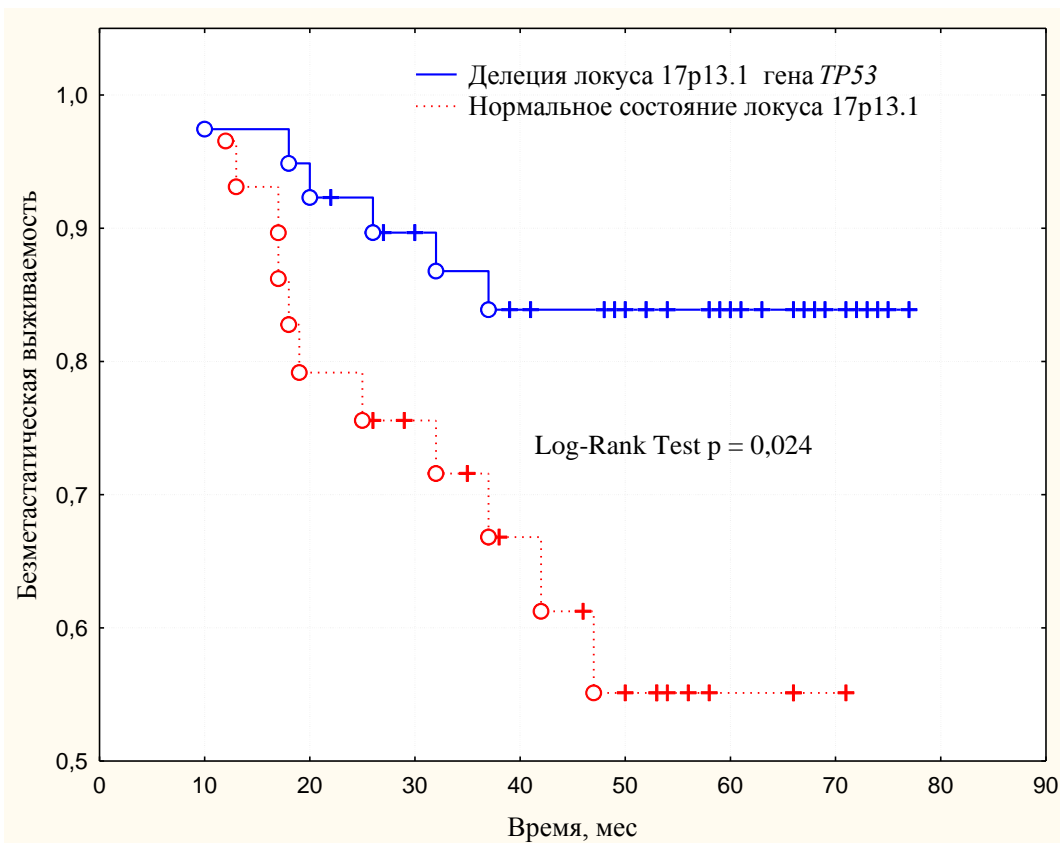


Рисунок 25. – Безметастатическая выживаемость больных раком молочной железы при делеции и нормальном состоянии локуса 17p13.1 гена *TP53*.

Таким образом, сочетание делеции одного аллеля с диким состоянием другого аллеля *p53* и нормального состояния локуса 17p13.1 с мутантным *p53*, с одной стороны, объясняет наблюдаемую на рисунке 25 связь гаплотипической недостаточности региона 17p13.1 с высокой безметастатической выживаемостью, с другой стороны, объясняет связь делеции локуса гена *TP53* с down-регуляцией ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Экзонный полиморфизм *TP53*+119C>G Arg72Pro rs1042522 и делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* влияют на негативную регуляцию экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ, кроме того, делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* является благоприятным прогностическим признаком.

4.6 Хромосомные aberrации в опухолевой ДНК и экспрессия ABC-транспортеров в процессе НАХТ

Геномная нестабильность, характеризуемая наличием структурных хромосомных аномалий отдельных локусов и числовых aberrаций целых хромосом, является неизменным атрибутом опухолевых клеток и одной из главных составляющих внутриопухолевой гетерогенности [Gordon D.J., et al., 2012, Hanahan D., et al., 2011, McGranahan N., et al., 2012, Smid M., et al., 2011]. Делеции или амплификации хромосомных регионов и отдельных хромосом называют aberrациями числа копий ДНК (CNA – Copy Number Aberration). Эти типы цитогенетических нарушений могут влиять на экспрессию генов, как правило, при делециях экспрессии генов, локализованных в делетированном регионе, снижена, при амплификациях - повышена [Huang N., et al., 2012, Xu Y., et al., 2012]. CNA особенно распространены при солидных опухолях различных локализаций, и в частности, в опухоли молочной железы (www.progenetix.org [Horlings H.M., et al., 2010]). Более двух десятилетий с применением методов FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization), сравнительной геномной гибридизации (CGH – Comparative Genomic Hybridization), а теперь и с помощью микроматричных технологий CGH-array и High-Density SNP-array проводятся исследования CNA.

Изучение хромосомных локусов, часто вовлеченных в CNA (так называемых горячих точек CNA), оказалось эффективной методологией для идентификации новых генов-супрессоров и онкогенов [McGranahan N., et al., 2012, Mullighan C.G., et al., 2007, Wiedemeyer R., et al., 2008]. Согласно базе www.progenetix.org по частоте встречаемости при опухолях всех изученных локализаций (177 типов опухолей) амплификация 8q24 оказалась наиболее распространенной CNA и встречалась более чем в 30% всех образцов [Cai H., et al., 2012]. Наиболее значимым геном в этом локусе по данным COSMIC является протоонкоген *c-Myc* [Jönsson G., et al., 2010]. Другие общие для многих локализаций CNA, наблюдаемые по крайней мере в 25 % опухолей, это амплификации 17q21, 1q21 и делеции регионов 8p23 и 9p21 (делеция гена ингибитора циклин-зависимой киназы *CDKN2A/B*) [Cai H., et al., 2012].

В опухоли молочной железы наиболее часто CNA наблюдается в регионах 1q, 8q и 16q. Амплификации отмечаются в 1q, 8p12, 8q24.21, 17q12, 11q13.3, и 11q13.5, охватывая такие известные онкогены, как *HER2*, *c-Myc*, *CCND1*, и *PAK1*, делеции – на 8p, 11q, 16q и 17p хромосомных локусах [Jönsson G., et al., 2010]. Есть сведения о связи CNA опухолевой ДНК с молекулярными подтипами РМЖ и экспрессионными характеристиками опухоли [Bergamaschi A., et al., 2006, Horlings H.M., et al., 2010, Smid

M., et al., 2011, Weigman V.J., et al., 2012]. Например, амплификации 1q21-43 и 16p12 хромосомных регионов и делеция 16q21-q24 связаны с наличием на клетках опухоли рецепторов к эстрогенам, а делеции 4p13-16 и 5q11.2-q31 сайтов ассоциированы с отсутствием прогестероновых рецепторов [Climent J., et al., 2007].

Большой интерес представляют работы, посвященные поиску специфических CNA паттернов, характеризующих высокий риск метастазирования РМЖ. В частности, установлено, что амплификации 8q22.3 и 11q14.1 регионов связаны с более низкими показателями безметастатической и общей выживаемости. [Chin S.F., et al., 2007, Zhang Y., et al., 2009]. Наличие делеции длинного плеча 11q хромосомы является неблагоприятным прогностическим фактором у больных с трижды негативным молекулярным подтипом рака молочной железы (клетки опухоли не имеют рецепторов к эстрогенам, прогестерону и эпидермальному фактору роста HER2), которые не получали адъювантную химиотерапию [Climent J., et al., 2007]. В исследовании Wikman с коллегами (2012) установлена область 11p15, делеция которой ассоциирована с высокой частотой гематогенного метастазирования в головной мозг [Wikman H., et al., 2012]. Однородительская дисомия (UPD – uniparental disomy) 17q, 13q в опухоли молочной железы, определяемая при помощи CGH-array, имеет существенное прогностическое значение как в отношении безметастатической, так и общей выживаемости пациентов [Tuna M., et al., 2012].

Ранее нами было продемонстрировано, что никакие клинико-морфологические параметры не связаны с негативной регуляцией экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ [Litviakov N.V., et al., 2013] (см. параграф 3.1). В подавляющем большинстве случаев генетические механизмы регуляции экспрессии ABC-транспортеров работают на повышение экспрессии в ответ на химиопрепараты и многие стрессирующие воздействия. Мы предположили, что если генные механизмы и сигнальные пути работают только на повышение экспрессии генов ABC, то надо искать другие уровни регуляции снижения экспрессии ABC-транспортеров, такие как хромосомный уровень, связанный с вариацией числа копий хромосомных локусов. Фундаментальная роль цитогенетических факторов опухоли и, в частности CNA, в регуляции экспрессии генов ABC практически в мире еще не изучалась. Мы полагаем, что паттерн регуляции экспрессии ABC-транспортеров закладывается еще в процессе трансформации опухолевых клеток и малигнизации и в этом случае, цитогенетические аномалии опухоли будут играть несомненную роль в формировании паттернов регуляции транспортеров лекарственных средств. В частности, мы предположили, что негативная регуляция опухолевой экспрессии генов ABC при воздействии химиопрепаратов связана с делециями локусов

ABC-транспортеров. Были также описаны структурные и числовые хромосомные аномалии опухоли молочной железы в изучаемой группе. Проанализирована связь изменения экспрессии генов ABC-транспортеров и CNA всех 852 цитобэндов.

Для исследования использовалась одна из революционных разработок в области цитогенетики – микроматрицы высокой плотности, позволяющие определять CNA, протяженностью 50 kbp и более. Самой последней разработкой лидера рынка микроматриц – фирмы Affymetrix (USA) явилась платформа CytoScan™ HD Array (<http://www.affymetrix.com/esearch/search.jsp?pd=prod520004&N=4294967292>), которая помимо 750 тыс обычных полиморфных локусов, более чем 36 тысяч генов, содержит 1 миллион 950 тысяч неполоморфных проб для анализа цитогенетических нарушений. ДНК микрочипы представляют большой интерес, это обусловлено в первую очередь тем, что ДНК маркеры относительно стабильны, а CNA являются основой процесса канцерогенеза и эволюции опухоли. Во-вторых, CNA связаны с экспрессией генов, в-третьих, технология ДНК микрочипов позволяет во многом нивелировать проблему внутриопухолевой гетерогенности, так как позволяет, с чувствительностью 5% видеть одновременно весь спектр мутантных опухолевых клонов.

В опухоли молочной железы наблюдаются структурные CNA в различных хромосомных областях. На рисунке 26 приведены частоты встречаемости CNA (амплификаций и делеций) по цитобэндам у всех обследованных больных в общей группе. Только в двух хромосомах – первой и восьмой встречаются амплификации в опухолевой ДНК более чем у 30% больных. Частота встречаемости амплификаций в цитобэндах длинного плеча 1 хромосомы (1q21.1 – 1q44) колеблется от 41 до 59% от общего числа образцов. Частые амплификации отмечаются в коротком (8p11.22 в 32,4% случаев) и длинном плечах 8 хромосомы (8q12.1 – 8q24.3 от 32% до 57% случаев). Реже встречаемые амплификации с частотой от 25% до 30% случаев отмечаются в регионах 8q11.21 – 23, 10p15.3 – 14, 14q32.33, 16p13.13, 17q24.2, 20q13.2 и 20q13.21. Делеции с частотой более 50% наблюдались в хромосомных регионах: 8p21.2, 16q21 – 24.1 и 17p13.3 – 17p11.2. С 40-50% частотой встречались делеции регионов: 4p14, 8p23.3 – 21.1, 11q22.1 – 24.3, 13q14.11 – 14.3, 13q14.2 – 14.3, 14q32.11 – 32.31, 16q12.1 – 13, 16q24.2 – 24.3 и 22q13.1. В целом спектр хромосомных регионов, несущих CNA, включает участки 1q, 8p, 8q, 11q, 16q, 17p и наши результаты соответствуют литературным данным [Jönsson G., et al., 2010]. Дополнительно CNA еще были отмечены в 13q и 14q32 регионах.

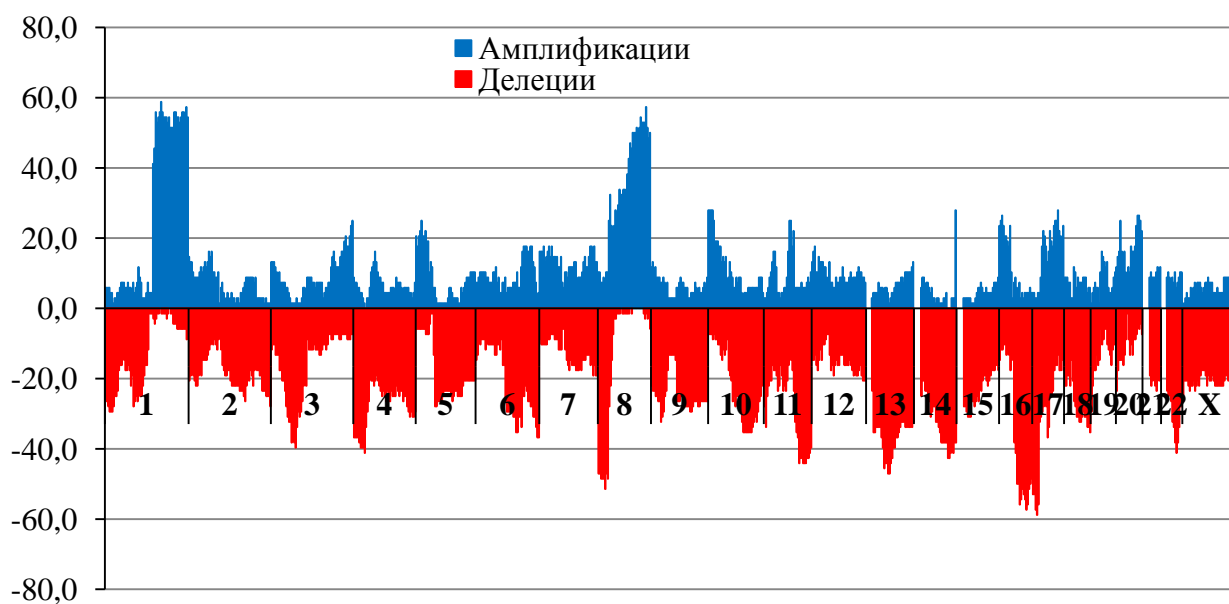


Рисунок 26. – Частота CNA в ДНК опухоли молочной железы до лечения.

Примечание: по оси ординат – процент больных, несущих CNA (амплификации – в положительном направлении, делеции в отрицательном направлении), по оси абсцисс – цитобэнды (n = 852), распределенные по хромосомам

В опухоли молочной железы также наблюдается большое количество числовых CNA (анеуплоидия встречается более чем в половине образцов), которые, в основном, представлены моносомией по отдельным хромосомам, намного реже встречаются трисомии. В опухоли 19 из 68 больных (28%) отмечается моносомия 13 хромосомы, далее по нисходящей: моносомия 14 хромосомы (12/68 – 18%), 15 хромосомы (9/68 – 13%), 4 и 18 хромосом по 7 случаев (10%), 17 хромосомы – 6 случаев (9%), 9 и X хромосомы – по 5 случаев (7%). Не встречались моносомии только в трех хромосомах: 1, 8 и 20, что свидетельствует об их важной роли в поддержании жизнеспособности опухолевых клеток. Это подтверждается наличием в этих хромосомах частых структурных CNA в виде амплификаций, отмеченных выше. Частота трисомии по отдельным хромосомам не превысила 4% (3 случая из 68) и в 2-3 случаях были отмечены трисомии 7, 8, 12, 17, 20 и 21 хромосом.

Количество цитобэндов с CNA в опухоли разных пациентов колеблется в очень широких пределах: от 1 до 608, что составляет от 0,1% до 75% от общего числа цитобэндов (рисунок 27 А), т.е. можно говорить о континууме частоты CNA. Встречаются пациенты, у которых в опухоли могут присутствовать протяженные делеции или амплификации в каждой хромосоме, в то время как у других они практически отсутствуют (рисунок 27 В и Б, соответственно).

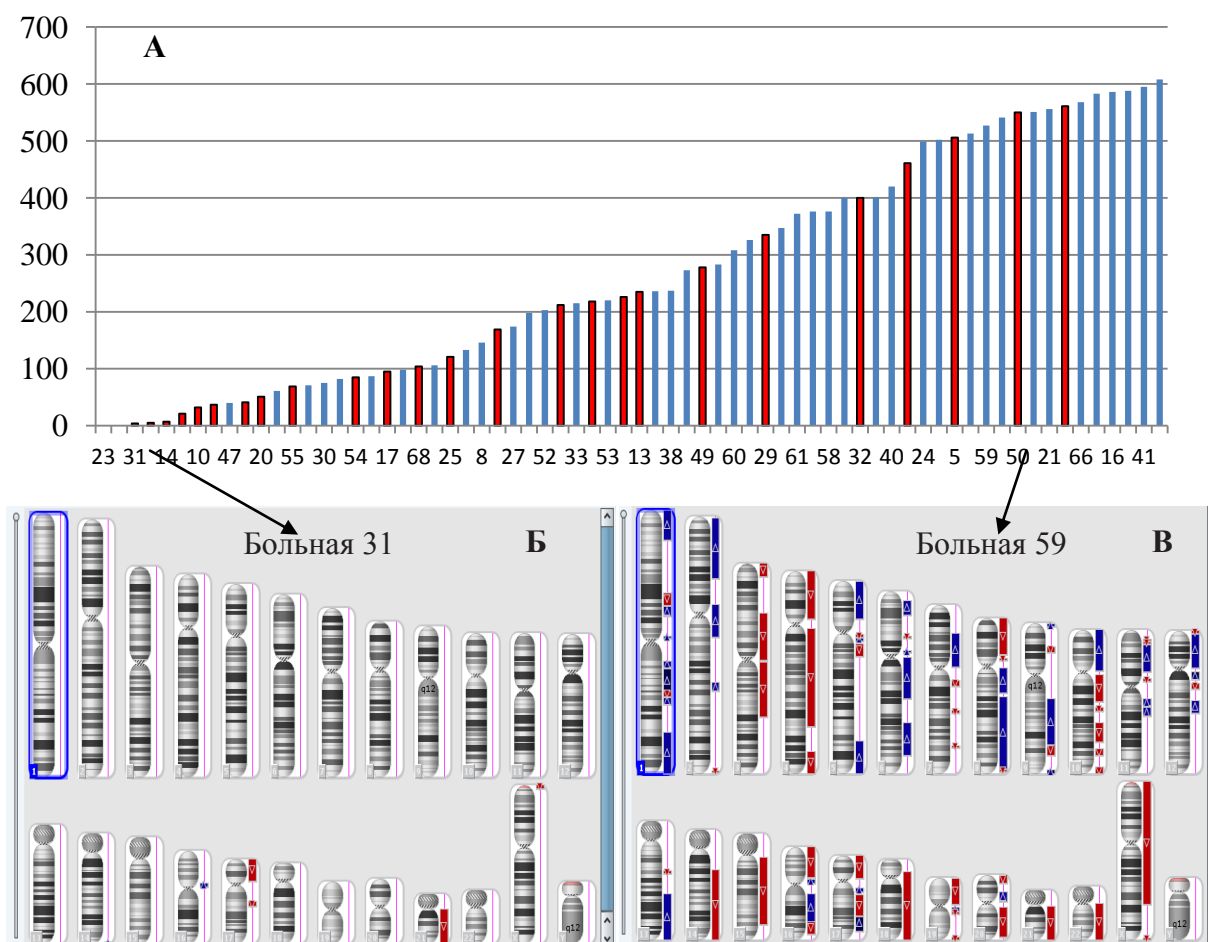


Рисунок 27. – Амплификации и делеции в ДНК опухолевой ткани больных РМЖ
 А – количество цитобэндов с CNA (делеции + амплификации) индивидуально у каждого больного раком молочной железы до лечения. Б – у больной 31 (слева) в опухолевой ткани практически отсутствуют делеции. В – у больной 59 CNA присутствуют в каждой хромосоме. На рисунке А по оси абсцисс – номера больных, по оси ординат – количество цитобэндов с CNA, красным цветом выделены столбики – отсутствие ответа на НАХТ (стабилизация или прогрессирование); на рисунке Б и В представлены окна программы Chromosome Analysis Suite 2.0, участки амплификации выделены синим, а участки делеций – красным.

Средняя частота выявленных амплификаций была почти в 2 раза ниже, чем частота делеций (92 против 170, $p = 0,0002$ по критерию Фишера), у 70,6% (48/68) больных амплификации встречались реже, чем делеции. В группе больных, у которых амплификаций было больше, чем делеций общая частота CNA в цитобэндах в 3 раза меньше, чем у больных, у которых делеции встречались чаще, чем амплификации (100 против 334, $p = 0,000001$).

Количество цитобэндов с CNA связано с эффективностью НАХТ. В группе больных РМЖ с числом цитобэндов с CNA менее 60 (11/68 – 16%) у 82% (9/11) отмечается отсутствие ответа на НАХТ (стабилизация или прогрессирование). У 41% (28/68)

пациентов отмечается высокий уровень CNA и частота цитобэндов с делециями или амплификациями более 300 (рисунок 28). 75% (21/28) этих больных отвечают на НАХТ.

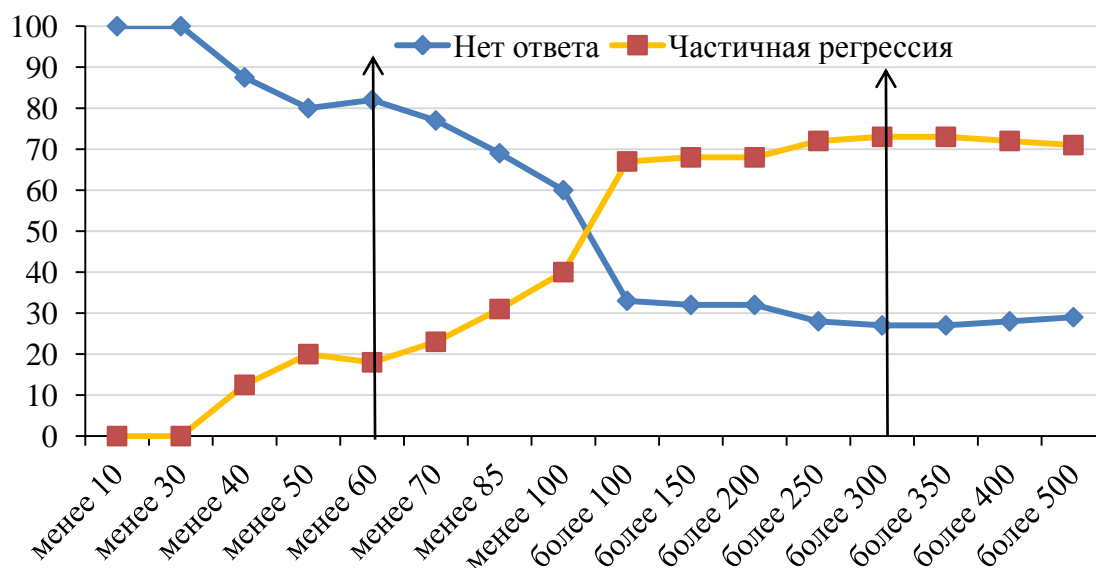


Рисунок 28. – Зависимость частоты ответа на НАХТ от количества цитобэндов с CNA в опухоли молочной железы до лечения. Стрелками представлены оптимальные показатели частоты цитобэндов с CNA для прогнозирования ответа на НАХТ.

Можно полагать, что существенный дисбаланс клеточных процессов в опухоли, связанный с большим количеством CNA и развитием генетической нестабильности, способствует более выраженному цитотоксическому действию конвенциональных химиопрепаратов, используемых при лечении. Прежде всего, это касается лекарственных средств, действующих на молекулу ДНК (циклофосфан, фторурацил и кселода). Это подтверждают данные McClelland с коллегами (2009), которые показали связь повышенного уровня CNA с резистентностью к таксанам и чувствительностью к препаратам платины [McClelland S.E., et al., 2009]. Оценка числа цитобэндов с CNA будет полезной при выборе химиопрепаратов для предоперационной терапии больных РМЖ.

Частота цитобэндов с CNA связана и с изменением экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы в процессе НАХТ. При снижении экспрессии генов *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и *MVP* в процессе НАХТ в опухолевой ткани наблюдается статистически значимо высокий уровень делеций, по сравнению с больными, у которых экспрессия этих генов в процессе НАХТ повышается (таблица 30).

Таким образом, частота цитобэндов с CNA связана с эффектом НАХТ и может использоваться для прогнозирования непосредственного эффекта лечения. Связь изменений экспрессии генов ABC-транспортёров с частотой делеций может свидетельствовать о возможном механизме down-регуляции экспрессии генов ABC при

проведении химиотерапии, который связан с делециями локусов генов ABC-транспортеров. Тем более, что роль несбалансированных хромосомных aberrаций (делеций и амплификаций) в транскрипции генов не раз подтверждалась в литературе [Henrichsen C.N., et al., 2009, Huang N., et al., 2012, Xu Y., et al., 2012].

Таблица 30. – Связь числа делеций и амплификаций в опухолевой ДНК с изменением экспрессии генов ABC в процессе НАХТ

Ген	Изменение	Амплификации	Делеции	Всего
ABCВ1	Повышение	83,7±13,2	135,8±27,7	219,6±38,0
	Снижение	99,6±10,1	199,2±25,1	298,8±30,0
p value		0,3354	0,0943	0,1024
ABCВ3	Повышение	90,3±14,3	157,1±29,3	247,4±39,5
	Снижение	91,4±9,9	172,7±24,7	264,2±30,4
p value		0,9503	0,6887	0,7365
ABCС1	Повышение	88,8±13,1	144,6±25,2	233,4±33,2
	Снижение	96,9±10,3	196,3±28,4	293,2±35,7
p value		0,6262	0,1788	0,2248
ABCС2	Повышение	90,9±14,6	146,8±31,0	237,8±42,1
	Снижение	93,4±9,5	186,7±23,6	280,2±28,7
p value		0,8791	0,3020	0,3920
ABCС5	Повышение	85,1±12,1	122,3±23,7	207,5±33,3
	Снижение	97,8±11,3	211,9±28,0	309,7±33,5
p value		0,4466	0,0177	0,0345
ABCГ1	Повышение	85,0±14,2	121,5±27,8	206,5±37,6
	Снижение	97,2±9,9	202,2±24,3	299,4±30,4
p value		0,4660	0,0356	0,0595
ABCГ2	Повышение	78,5±12,3	128,0±24,1	206,6±33,4
	Снижение	105,2±10,8	207,5±27,8	312,7±33,6
p value		0,1081	0,0374	0,0296
MVP	Повышение	83,1±13,8	109,9±27,1	193,0±36,8
	Снижение	98,8±10,0	212,3±23,9	311,1±29,9
p value		0,3448	0,0066	0,0149

Примечание: p value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни; полужирным шрифтом отмечены статистически значимые различия.

Следующим шагом в исследовании был анализ связи делеций локусов генов ABC-транспортеров с экспрессией своих генов и частотой объективного ответа на НАХТ (таблица 31).

Установлено, что в подавляющем большинстве случаев при делеции локуса гена ABC наблюдается снижение его экспрессии в процессе НАХТ, т.е. делеция локуса является механизмом down-регуляции гена в процессе НАХТ. Среди пациентов, у которых в опухоли отмечались делеции локусов ABC-транспортеров в 75%-100% случаев экспрессии делетированного гена ABC в процессе НАХТ снижалась (снижение уровня экспрессии гена в пост-НАХТ образцах опухоли по сравнению с парными пре-НАХТ

образцами). Нужно отметить, что, в зависимости от гена у 9-49% пациентов со снижением экспрессии гена ABC наблюдалась делеция его локуса, т.е. делецией локуса можно объяснить 9-49% случаев снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ.

Таблица 31. – Частота снижения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ, делеции их локусов в опухолевой ДНК и эффективность НАХТ.

Ген	Локус гена	Кол-во случаев снижения экспрессии	Всего делеций локуса гена ABC	Частота делеция локуса гена ABC при снижении его экспрессии от случаев снижения	Частота снижения экспрессии и при делеции локуса гена ABC	Частота объективного ответа на НАХТ при делеции локуса гена ABC
<i>ABCB1</i>	7q21.1	39	10	10 (25,6%)	100%	100%
<i>ABCB3</i>	6p21.32	41	7	6 (14,6%)	86%	100%
<i>ABCC1</i>	16p13.1	34	8	7 (20,6%)	88%	88%
<i>ABCC2</i>	10q24	41	24	20 (48,8%)	83%	71%
<i>ABCC5</i>	3q27	33	4	3 (9,1%)	75%	100%
<i>ABCG1</i>	21q22.3	41	13	10 (24,4%)	77%	62%
<i>ABCG2</i>	4q22.1	37	14	11 (29,7%)	79%	79%
<i>MVP</i>	16p11.2	40	7	6 (15,0%)	86%	86%

Наибольшая частота делеций локуса была у гена *ABCC2* (49% случаев снижения экспрессии), у других значимых для формирования МЛУ генов частоты делеций локусов колебались около 20-25%. Наименьшая частота делеций была у локуса 3q27 гена *ABCC5* и составила 9% от всех случаев снижения экспрессии гена *ABCC5*. Кроме того, при делеции локусов ABC-транспортеров отмечается хороший ответ опухоли на НАХТ. Все 100% пациентов с делециями локусов 7q21.1, 6p21.32 и 3q27 генов *ABCB1*, *ABCB3* и *ABCC5* соответственно, ответили на НАХТ. Объективный клинический ответ НАХТ у больных РМЖ с делециями локусов генов *ABCC1* (16p13.1), *ABCC2* (10q24), *ABCG1* (21q22.3) и *ABCG2* (4q22.1) составил 62% – 88%. Эти данные подтверждают хорошую ассоциацию между делециями локусов генов ABC-транспортеров с эффективностью НАХТ.

Кроме того, при делеции хотя бы в одном из локусов генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP* отмечается очень хорошая безметастатическая выживаемость – метастазы были отмечены только у 1 больного из 22 в группе с делецией хотя бы одного из генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP*, в то время как в группе без делеции локусов этих генов метастазы наблюдались у 15/46 больных. Наличие делеции локусов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG2* и/или *MVP* «защищает» от развития метастазов с OR = 0,098(0,012 – 0,803), p = 0,013, т.е. наличие делеции в локусах генов ABC-транспортеров может

выступать как благоприятный прогностический фактор. Безметастатическая выживаемость изученных групп представлена на рисунке 29.

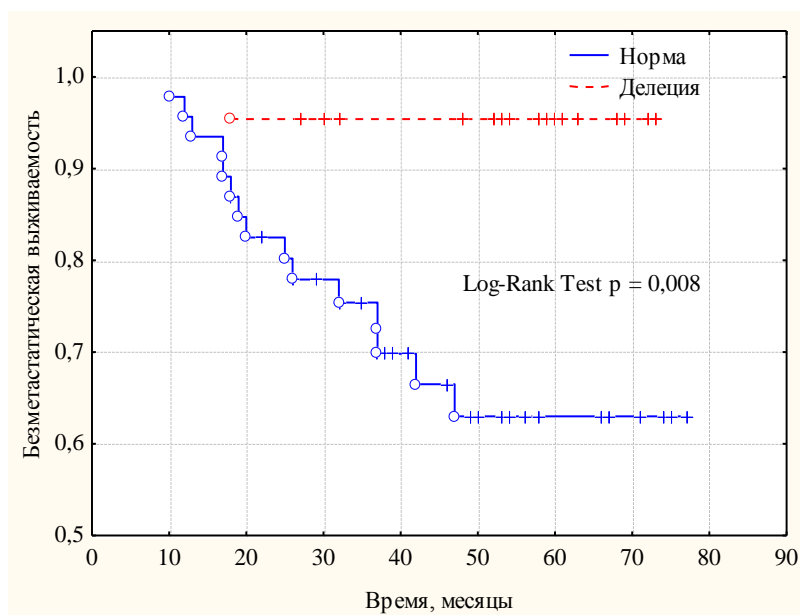


Рисунок 29. – Безметастатическая выживаемость у больных с делецией хотя бы одного из локусов генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP*

В таблице 32 представлен уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ при нормальном состоянии локуса гена ABC и при его делеции. До лечения уровень экспрессии всех изученных генов в опухоли у больных с делецией локуса и без делеции локуса не различался. После курсов НАХТ у больных с делецией гена ABC уровень его экспрессии опухоли был ниже, чем у больных с нормальным состоянием локуса этого гена. Статистически значимые различия достигнуты для генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2*. Уровень экспрессии в пост-НАХТ образцах при делеции локуса в 2,5-7,5 раз ниже, чем в образцах после НАХТ без делеции.

Таким образом, в 9-49% случаев снижение экспрессии генов ABC в процессе НАХТ может быть обусловлено делецией локуса этого гена в опухолевой ДНК. Делеция локусов генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC5*, *ABCG2* и *MVP* связаны с высокой ожидаемой эффективностью НАХТ на уровне 79-100%. Если хотя бы в одном из локусов генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG2* или *MVP* в опухолевой ДНК, взятой до лечения, наблюдается делеция, то у таких больных можно прогнозировать очень высокую безметастатическую выживаемость на уровне 95%, т.е. делеция локусов этих генов является благоприятным прогностическим фактором.

Таблица 32. – Уровень экспрессии ABC-транспортеров до лечения и после НАХТ у больных с нормальным состоянием и делецией соответствующего локуса гена ABC.

Гены	Точка	Норма	Делеция	p-value
<i>ABCB1</i>	До лечения	3,18±0,73	4,05±1,81	0,584
	После НАХТ	4,29±1,25	0,57±0,28	0,028
<i>ABCB3</i>	До лечения	0,85±0,09	1,15±0,69	0,416
	После НАХТ	0,90±0,22	0,46±0,18	0,253
<i>ABCC1</i>	До лечения	1,33±0,32	0,83±0,25	0,689
	После НАХТ	1,53±0,37	0,43±0,16	0,047
<i>ABCC2</i>	До лечения	3,54±0,91	2,22±0,72	0,096
	После НАХТ	3,77±1,36	1,55±0,59	0,032
<i>ABCC5</i>	До лечения	2,28±0,43	3,34±1,33	0,194
	После НАХТ	2,70±0,45	3,08±1,35	0,560
<i>ABCG1</i>	До лечения	2,03±0,47	1,12±0,44	0,409
	После НАХТ	1,78±0,39	0,33±0,10	0,009
<i>ABCG2</i>	До лечения	2,02±0,38	1,93±0,88	0,306
	После НАХТ	2,50±0,51	0,78±0,34	0,044
<i>MVP</i>	До лечения	0,51±0,12	0,46±0,21	0,990
	После НАХТ	0,60±0,16	0,21±0,08	0,275

Примечание: p-value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни; полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Итак, делеция локуса гена ABC в опухоли является одной из причин down-регуляции его экспрессии в процессе химиотерапии. Опухоль больных с делецией хотя бы одного локуса гена ABC оказывается чувствительной к НАХТ. Последнее согласуется с данными Flahaut et al., (2006), которые показали, что клеточные линии нейробластомы IGRN-91 и LAN-1R с делецией 7q (локализация *ABCB1*) были чувствительны к химиотерапии доксорубицином. В целом, данных по делеции локусов ABC-транспортеров в ассоциации с их экспрессией и чувствительностью к химиотерапии крайне мало. Напротив, амплификация локусов генов ABC в контексте химиорезистентности обсуждается более широко. Показано, что амплификация локусов ABC-транспортеров обуславливают формирование резистентных опухолевых линий и повышенный уровень их экспрессии при многократной обработки химиопрепаратами. [Flahaut M., et al., 2006, Kato H., et al., 2005, Pang E., et al., 2005, Van Dekken H., et al., 2008].

До лечения уровень экспрессии любого из изученных генов в опухоли у больных с делецией локуса и без делеции локуса не различался (таблица 32). Гаплотипическая недостаточность локуса гена ABC в опухолевых клетках никак не проявляет себя до лечения, при отсутствии каких-либо воздействий на опухоль. Только после воздействия химиопрепаратов экспрессия делетированного гена в опухоли оказывается ниже, чем у больных без делеции (таблица 32). Учитывая, что большинство известных механизмов регуляции экспрессии ABC-транспортеров направлены на активацию их экспрессии под действием химиопрепаратов непонятно, как аллельная делеция гена приводит к снижению

его экспрессии в процессе НАХТ. Можно предположить несколько механизмов. Самый простой вариант, это когда в результате аллельной делеции повышение экспрессия гена МЛУ в опухолевых клетках в ответ на химиотерапию оказывается не достаточным для элиминации лекарственных средств. Опухолевые клетки оказываются чувствительными к химиотерапии и гибнут, при этом суммарная экспрессия ABC-транспортера с делецией, оцениваемая нами во всей опухолевой ткани, снижается за счет уменьшения содержания в ней опухолевых клеток, экспрессирующих ген ABC. Это гипотеза, в том числе будет проверена ниже при изучении клональной эволюции опухоли в процессе НАХТ.

Различные сигнальные проводящие пути и транскрипционные факторы влияют на МЛУ, такие как Ras-зависимый путь, цАМФ / протеинкиназный путь (РКА), фосфатидилинозитол-3-киназа (PI3K) / протеинкиназа В (Akt) путь, связывающий белок Y-коробки 1 (YB-1), *PTEN*, p53, протеинкиназа С и другие протеинкиназы [Sui H., et al., 2012]. При дезрегуляции этих сигнальных путей не будет происходить активации экспрессии генов ABC-транспортеров под действием химиопрепаратов. В свою очередь дезрегуляция может быть следствием многочисленных хромосомных нарушений, фиксируемых в опухолях. По нашим данным более чем у 40% больных более трети цитобэндов несут СНА. Эти механизмы могут объяснить феномен снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе химиотерапии, но они не объясняют снижение экспрессии генов МЛУ при делеции их локусов.

В единичном исследовании было показано, что цитокины, в частности ФНО- α , может down-регулировать экспрессию генов ABC-транспортеров [García M.G., et al., 2005].

Интересный механизм регуляции экспрессии генов представлен в публикации [Leung A.K., et al., 2010] с участием микроРНК во время стрессорного воздействия на клетки (в качестве которого может выступать и воздействие химиопрепаратами). В клетке существует некий базальный уровень экспрессии мРНК таргетных генов и одновременно определенный постоянный уровень микроРНК, которые down-регулируют таргетные гены. В результате экспрессия мРНК гена держится на постоянном уровне. При стрессорном воздействии уровень таргетных мРНК (например мРНК генов ABC) повышается и насыщает пороговый уровень микроРНК и при дальнейшем повышении таргетной мРНК она перестает разрушаться посредством микроРНК и происходит синтез белка. При гаплотипической недостаточности гена ABC уровень его мРНК возрастает под воздействием химиопрепарата очень медленно и не успевает насытить пороговый уровень микроРНК. В результате этого экспрессия делетированных генов ABC-транспортеров в опухолевых клетках не повышается в ответ на лечение, и опухоль становится уязвимой.

В опухоли молочной железы кроме локусов генов ABC-транспортёров во множестве других хромосомных регионов наблюдается вариация числа копий ДНК, которые приводят к изменениям уровня экспрессии многих генов и микроРНК. Возможно, что эти избыточно или недостаточно экспрессируемые, в следствие CNA, гены и микроРНК связаны с down-регуляцией экспрессии делетированных генов ABC. Для того чтобы определять хромосомные регионы с CNA, которые могут участвовать в регуляции делетированных генов ABC-транспортёров мы провели анализ связи наличия делеции локусов генов ABC и CNA всех цитобэндов. Для этого всех обследованных больных разделили на две группы: первую группу составили больные, у которых хотя бы в одном из локусов всех изученных генов ABC-транспортёров наблюдается делеция ($n = 34$); во вторую группу вошли больные, у которых не было делеции локусов изученных генов ABC-транспортёров ($n = 34$). На рисунке 29 представлены частоты больных с CNA по всем 852 цитобэндам в группах с делециями локусов генов ABC (рисунок 29а) и без делеций (рисунок 29б).

Было проведено сравнение частот делеций и амплификаций по всем цитобэндам в этих двух группах. Оказалось, что у 85% (29/34) больных с делецией хотя бы одного локуса гена ABC-транспортёра наблюдалась делеция в длинном плече 13 хромосомы в регионе 13q14.2. У больных без делеций локусов генов МЛУ только в 9% (3/34) случаев отмечалась делеция 13q14.2. По критерию Фишера различия между двумя группами по частоте встречаемости делеции 13q14.2 были статистически значимыми ($p = 2.03 \times 10^{-11}$). Делеция локуса 13q14.2 у больных хроническим лимфолейкозом связана с лучшей общей выживаемостью, по сравнению с больными без делеции в этом регионе [Döhner H., et al., 2000, Gunnarsson R., et al., 2011].

Цитогенетический бэнд 13q14.2 – это протяженный регион 13 хромосомы, в котором, согласно GeneCard v3.0 локализовано 2 генетических локуса, 28 кодирующих белки генов, 23 псевдогена, 19 генов РНК. Среди кодирующих белки генов, наиболее известным является ген-супрессор опухолевого роста *RB1*. Гаплотипическая недостаточность *RB1* отмечается у 85% больных с делецией локусов генов ABC-транспортёров и может выступать в качестве драйверной мутации в этой группе. Возможность того, что мутации *RB1* могут выступать в качестве драйверных была подтверждена экспериментально [Jiang Z., et al., 2011]. Недавно было показано, что *HDAC1* и 2 (Histone Deacetylase) ингибируют экспрессию генов *ABCB1* и *ABCC2* их продуктов в клеточных культурах colorectal adenocarcinoma и carcinoma [Xu Y., et al., 2012]. В свою очередь *HDAC1* и 2 находятся в реципрокных отношениях с *RB1*. *pRB1*

может рекрутировать *HDAC1* и *2*, взаимодействуя через мотив LXCXE и образуя комплекс с фактором транскрипции E2F1 [Talluri S., et al., 2012].

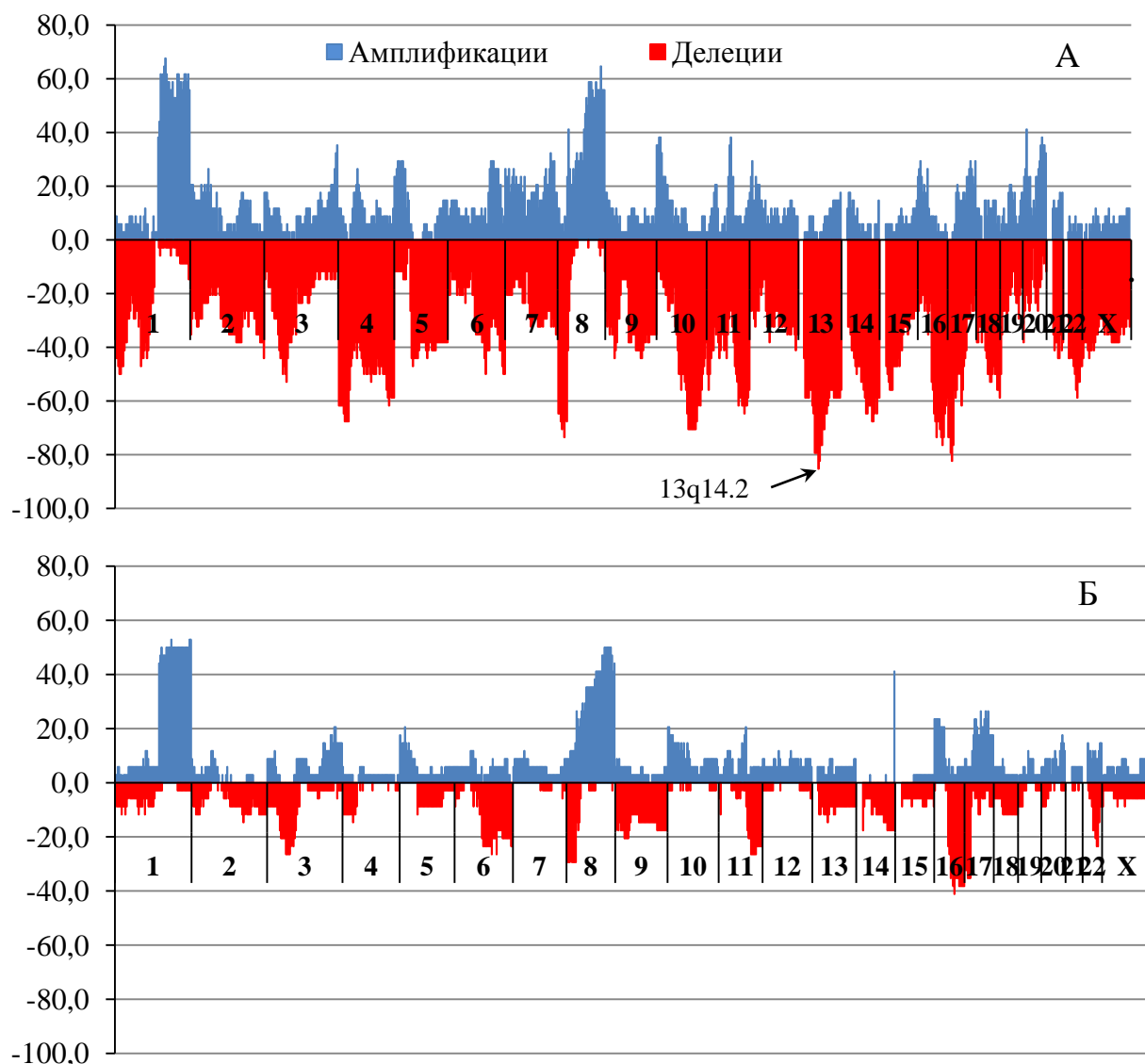


Рисунок 29. – Частота aberrаций числа копий ДНК в группах больных делецией локусов генов ABC-транспортеров (А) и без делеции локусов генов ABC-транспортеров (Б).

Примечание: на рисунках А и Б по оси ординат – процент больных, несущих CNA (амплификации – выше оси абсцисс, делеции – ниже оси абсцисс), по оси абсцисс – цитобэнды (n = 852), распределенные по хромосомам.

Можно предположить, что гаплотипическая недостаточность *RB1* в опухоли больных с делецией локусов генов ABC-транспортеров может приводить к повышению экспрессии *HDAC1* и *2*, которые в свою очередь снижают экспрессию генов ABC. Примечательно, что в нашей выборке локус гена *HDAC1* 1p35.1 делетирован всего в 11 случаях из 68 (16%) локус гена *HDAC2* 6q21 делетирован в два раза чаще (24/68, 35% случаев). Почему в опухоли больных с делецией локусов ABC-транспортеров отмечается делеция локуса гена *RB1* не понятно, хотя возможна и диаметрально-противоположная

постановка вопроса. Хочется также отметить, что *HDAC1* (601241) входит в число генов, которые согласно базам данных GeneCard, miRBase и NCBI взаимодействуют с ABC-транспортерами, что в определенной мере подтверждает нашу гипотезу о механизме регуляции экспрессии генов ABC через деацетилазу гистонов и *RB1*.

На следующем этапе мы попытались идентифицировать хромосомные локусы, связанные с регуляцией экспрессии ABC-транспортеров. Для этого проанализировали ассоциацию CNA во всех 852 цитобэндах с изменением экспрессии гена *ABCB1*. На рисунке 30 представлены частоты CNA в опухоли больных со снижением экспрессии гена *ABCB1* (рисунок 28А) и с повышением экспрессии *ABCB1* (рисунок 30Б) в процессе НАХТ. Была отдельно вычислена разница по частоте амплификаций и делеций в опухоли у пациентов со снижением и повышением экспрессии гена *ABCB1* (рисунок 30 В и Г). Наибольшая разница по амплификациям (35 – 43%) наблюдалась в длинном плече 1 хромосомы (максимальная – для цитобэндов 1q32.2 и 1q44). Амплификация локуса 1q32.2 длинного плеча 1 хромосомы ассоциирована со снижением экспрессии гена *ABCB1* в процессе НАХТ. У 72% больных с амплификацией локуса 1q32.2 наблюдается снижение экспрессии гена *ABCB1*, тогда как у 66% больных с нормальным состоянием 1q32.2 хромосомного региона отмечается повышение экспрессии гена *ABCB1*. Анализ с использованием критерия Фишера показал, что наличие/отсутствие амплификации в 1q32.2 цитобэндах связано с изменением экспрессии гена *ABCB1* с уровнем доверительной вероятности $p = 0,003$. Наибольшая разница по частоте встречаемости делеций 47% в опухолях у пациентов со снижением и повышением экспрессии гена *ABCB1* наблюдается по локусу 11q22.3 длинного плеча 11 хромосомы. У 64% (25/39) больных с делецией 11q22.3 отмечается снижение экспрессии *ABCB1* при проведении НАХТ, а у 83% (24/29) больных с нормальным состоянием региона отмечено повышение экспрессии *ABCB1* в процессе химиотерапии.

Согласно данным GeneCard 3.0 в цитобэнде 1q32.2 содержится 35 кодирующих белок генов 19 псевдогенов и 26 РНК-генов. В регионе 1q44 в общей сложности содержится 174 генетических элемента. Регион 11q22.3 содержит 84 генетических элемента. Кроме того, в сайте 11q22.3 локализован известный ген *ATM* (Ataxia-Telangiectasia Mutated), который играет ключевую роль в интеграции сигналов от поврежденной ДНК и их дальнейшей передаче к разнообразным эффекторам: *ATR* (*ATM* Related), *Nbs1*, *Chk1* и *Chk2*. Белок *Atm*, имеющий структурное сходство с фосфатидилинозит-3-киназой (*PI3K*), накапливается в местах повреждений и приобретает киназную активность, связывая фосфорилированные белки хроматина (*H2AX* и др.) и

белки-сенсоры нарушений структуры ДНК [Goodarzi A.A., et al., 2003, Shiloh Y., 2001, Shiloh Y., 2003].

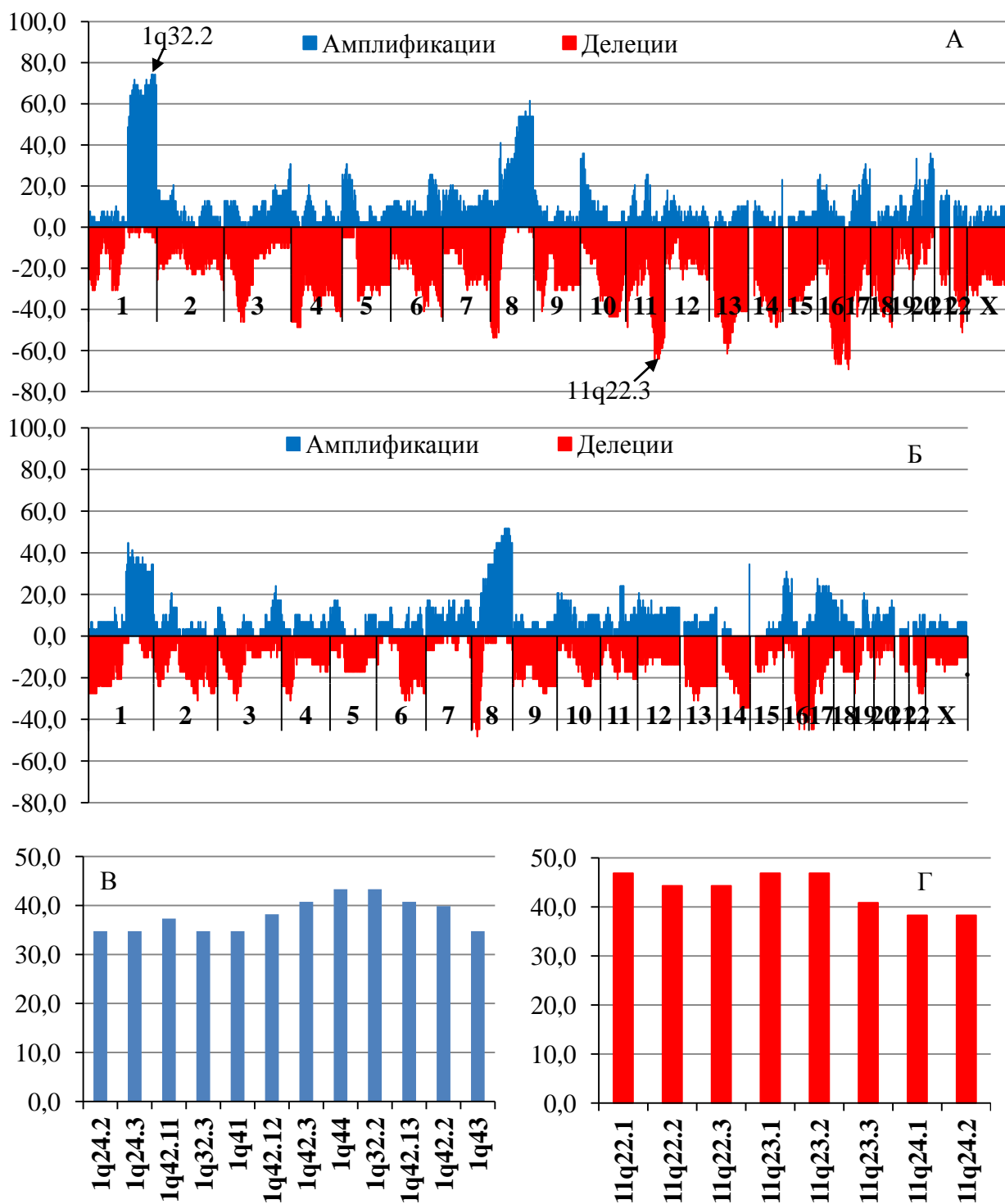


Рисунок 30. – Частота CNA опухолевой ДНК у больных со снижением экспрессии гена *ABCB1* (А) и с повышением экспрессии гена *ABCB1* (Б) в процессе НАХТ. Наибольшая разница в частоте амплификаций (В) и делеций (Г) в опухоли пациентов со снижением и повышением экспрессии гена *ABCB1*.

Примечание: на рисунках А и Б по оси ординат – процент больных, несущих CNA (амплификации – выше оси абсцисс, делеции – ниже оси абсцисс), по оси абсцисс – цитобэнды (n = 852), распределенные по хромосомам, на рисунке В и Г по оси ординат – разница в процентах; по оси абсцисс – цитобэнды, показавшие наибольшую разницу.

Активированная форма *ATM* фосфорилирует ряд своих мишеней и запускает репарацию ДНК [Guo N., et al., 2002, Ho C.C., et al., 2006, Jia X.Z., et al., 2009, Neganova I., et al., 2011, Saito S., et al., 2002, Vaziri C., et al., 2003, Zhu Y., et al., 2004]. Снижение экспрессии *ATM* может приводить к снижению репаративного потенциала опухолевых клеток и повышению чувствительности к действию химиотерапевтических препаратов, направленных на ДНК. В нашем исследовании при делеции *ATM*-содержащего локуса 11q22.3 у 25/30 (83%) больных отмечается объективный ответ на НАХТ, тогда как при нормальной состоянии *ATM*-содержащего локуса 11q22.3 только 16/38 (42%) больных отвечали на НАХТ ($p = 0,0009$). Кроме того, следствием снижения репаративного потенциала опухолевых клеток, непременно должна была явиться повышенная частота несбалансированных хромосомных aberrаций в опухоли больных при делеции *ATM*-содержащего локуса 11q22.3. Это подтверждается нашими данными сравнения количества цитобэндов с амплификациями, делециями и их суммы у больных с делецией локуса 11q22.3 и с нормальным состоянием этого локуса (рисунок 31).

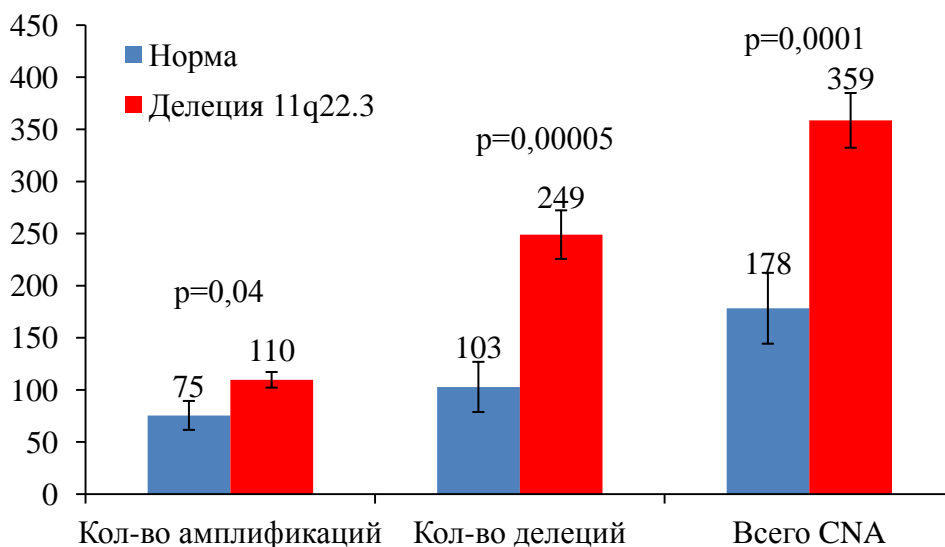


Рисунок 31. – Количество цитобэндов с CNA у больных с делецией локуса 11q22.3 и с нормальным состоянием локуса. Уровень доверительной вероятности по критерию Стьюдента

При делеции *ATM*-содержащего локуса 11q22.3 наблюдается высокий уровень амплификаций (больше в 1,5 раза) и делеций (больше в 2,4 раза) в опухоли молочной железы (рисунок 31). Примечательно, что нормальное состояние *ATM*-содержащего локуса 11q22.3 сочетается с нормальным состоянием локуса 7q21.1 гена *ABCBI*, не было отмечено ни одной делеции 7q21.1 при нормальном состоянии длинного плеча 11 хромосомы, все 10 случаев делеции локуса 7q21.1 гена *ABCBI* наблюдались при делеции *ATM*-содержащего локуса 11q22.3. Наконец, *ATM* мог оказывать влияние на экспрессию

ABCB1 через ген *TP53* и через ген *BRCA1*, которые он стабилизирует при фосфорилировании [X.Z. Jia, 2009, I. Neganova, 2011]

Аналогично тому, как мы определили ассоциацию CNA во всех 852 цитобэндах с изменением экспрессии гена *ABCB1*, на следующем этапе точно также мы проанализировали связь CNA с изменениями экспрессии других ABC-транспортеров. Результаты этого анализа представлены в таблице 33. Установлено, что амплификация локуса 1q32.2 длинного плеча 1 хромосомы и делеция локуса 11q22.3 ассоциированы со снижением экспрессии не только гена *ABCB1*, но также и генов *ABCC2* и *ABCG2* в процессе НАХТ, а нормальное состояние локуса с повышением экспрессии этих генов. Можно полагать, что гены *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG2* образуют единый кластер с общими механизмами регуляции экспрессии при помощи единого регуляторного паттерна. Это подтверждается взаимной корреляцией уровня экспрессии этих трех генов до лечения и после НАХТ (таблица 34).

Таблица 33. – Локусы с амплификациями и делециями, ассоциированные со снижением и повышением экспрессии генов ABC в процессе НАХТ

Гены	CNA	Локус с CNA, связанный с изменением экспрессии генов ABC	Локус с наибольшей частотой в группе со снижением	Повышение при CNA/Повышение при норме	Снижение при CNA/снижение при норме	p-value
<i>ABCB1</i>	Ампл-я	1q32.2 (43,4)	1q32.2 (74,4)	10/19 (34/66)	28/11 (72/28)	0,003
	Делеция	11q22.3 (46,7)	17p13.1 (69,2)	5/24 (17/83)	25/14 (64/36)	0,0002
<i>ABCB3</i>	Ампл-я	8p11.23 (28,9)	1q23.3 (63,4)	2/24 (8/92)	15/26 (37/63)	0,009
	Делеция	8p23.3 (25,0)	17p13.1 (63,4)	16/11 (59/41)	15/26 (37/63)	0,084
<i>ABCC1</i>	Ампл-я	16p11.2 (29,4)	1q23.3 (70,6)	13/21 (38/62)	3/31 (9/91)	0,008
	Делеция	1p22.1 (29,4)	17p13.1 (64,7)	4/30 (12/88)	14/20 (41/59)	0,012
<i>ABCC2</i>	Ампл-я	1q32.2 (31,3)	1q32.2 (68,3)	11/16 (41/59)	27/14 (66/34)	0,049
	Делеция	11q22.3 (60,9)	17p13.1 (68,3)	2/25 (7/93)	28/13 (68/32)	8.1x10⁻⁷
<i>ABCC5</i>	Ампл-я	1q23.3 (22,6)	1q23.3 (69,7)	16/18 (47/53)	23/10 (70/30)	0,083
	Делеция	3p21.1 (39,9)	17p13.1 (69,7)	6/28 (17/83)	19/14 (58/42)	0,0009
<i>ABCG1</i>	Ампл-я	1q42.2 (39,8)	1q42.2 (73,2)	9/18 (33/67)	29/12 (71/29)	0,003
	Делеция	17p13.1 (36,1)	17p13.1 (73,2)	10/17 (37/63)	30/11 (73/27)	0,005
<i>ABCG2</i>	Ампл-я	1q32.2 (43,4)	1q32.2 (75,7)	11/20 (35/65)	27/10 (73/27)	0,003
	Делеция	11q22.3 (33,7)	17p13.1 (70,3)	8/23 (26/74)	22/15 (59/41)	0,007
<i>MVP</i>	Ампл-я	1q24.2 (38,3)	1q23.3 (71,4)	8/18 (31/69)	29/13 (69/31)	0,003
	Делеция	16q22.3 (42,1)	17p13.1 (69,0)	7/19 (27/73)	29/13 (69/31)	0,001

Примечание: p-value – уровень доверительной вероятности по двухстороннему критерию Фишера; в скобках частоты встречаемости, %, в первом столбце в скобках указаны разность частот встречаемости локуса между группами с повышением и снижением экспрессии гена; цветами выделены общие для разных генов локусы.

Общие механизмы регуляции экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG2* могут быть реализованы с участием генов, локализованных в регионах 1q32.2 и 11q22.3, которые и

могут образовывать регуляторный паттерн. Его подробное исследование может способствовать выявлению новых мишеней для управления формированием множественной лекарственной устойчивости опухоли через генное регулирование экспрессии ABC-транспортеров.

Таблица 34. – Корреляция уровней экспрессии ABC-транспортеров в опухоли до лечения и после НАХТ

	<i>ABCB1</i> до лечения	<i>ABCB1</i> после НАХТ	<i>ABCC2</i> до лечения	<i>ABCC2</i> после НАХТ	<i>ABCG2</i> до лечения	<i>ABCG2</i> после НАХТ	<i>ABCC1</i> до лечения
<i>ABCB1</i> до лечения	1						
<i>ABCB1</i> после НАХТ	0,73	1					
<i>ABCC2</i> до лечения	0,59	0,56	1				
<i>ABCC2</i> после НАХТ	0,44	0,61	0,73	1			
<i>ABCG2</i> до лечения	0,65	0,57	0,67	0,62	1		
<i>ABCG2</i> после НАХТ	0,51	0,69	0,58	0,71	0,7	1	
<i>ABCC1</i> до лечения	0,52	0,37	0,51	0,33	0,41	0,28	1
<i>ABCC1</i> после НАХТ	0,32	0,51	0,36	0,53	0,37	0,47	0,59

Примечание: в таблице представлен коэффициент корреляции Спирмена; цветом выделены статистически значимые корреляты.

По-видимому, вторым регуляторным регионом следует признать локус 1q23.3, амплификации этого локуса с наибольшей частотой встречается при снижении экспрессии генов *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC5* и *MVP* (таблица 33). Изменение экспрессии этих генов в меньшей степени влияет на эффективность НАХТ, об этом можно судить по меньшему уровню p-value доверительной вероятности (для *ABCB3* он даже не достигает уровня <0,05) (таблица 10).

Интересным результатом проведенного анализа, явилось идентификация общего, для всех изученных генов МЛУ, локуса, делеции которого с наибольшей частотой (в 63-74% случаев) встречались при снижении экспрессии этих генов в процессе НАХТ. Это локус 17q13.1 (выделен в таблице 33 голубым цветом). Его делеция сопряжена со снижением экспрессии всех ABC-транспортеров в процессе НАХТ. В области 17q13.1 локализован хорошо известный ген-супрессор опухолевого роста – *TP53*. Получается, что *TP53* участвует в регуляции всех исследованных нами ABC-транспортеров. Причем, его гаплотипическая недостаточность ассоциирована с негативной регуляцией генов МЛУ, что косвенно подтверждает выдвинутую нами гипотезу о сопряженности делеции локуса гена *TP53* с диким состоянием оставшегося аллеля и точковой мутации *TP53* при нормальном состоянии локуса 17q13.1. Справедливости ради надо отметить, что помимо

TP53 в цитогенетическом регионе 17q13.1 есть и другие 226 генетических элементов (кодирующих белки генов, псевдогенов и РНК генов).

Таким образом, хромосомные аномалии в опухолевой ДНК оказывают существенное влияние на регуляцию экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ. В зависимости от гена у 9-49% пациентов со снижением экспрессии гена МЛУ наблюдалась делеция его локуса, т.е. делецией локуса можно объяснить 9-49 % случаев снижения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Наибольшая частота делеций локуса была у гена *ABCC2* (49% случаев снижения экспрессии), у других значимых для формирования МЛУ генов частоты делеций локусов колебались около 20-25%. В регуляции делетированных генов ABC-транспортеров играет роль регион 13q14.2. У 85% (29/34) больных с делецией хотя бы одного локуса гена МЛУ наблюдалась делеция в длинном плече 13 хромосомы 13q14.2. У больных без делеций локусов генов ABC только в 9% (3/34) случаев отмечалась делеция 13q14.2. В 13q14.2 локализован ген-супрессор опухолевого роста *RBI* и его регуляторная роль на гены ABC-транспортеров может быть реализована через гены деацетилазы гистонов – *HDAC1* и 2. Помимо делеций локусов генов ABC-транспортеров с регуляцией их экспрессии в процессе НАХТ связаны аномалии ряда хромосомных регионов, которые формируют три регуляторных кластера. Амплификация локуса 1q32.2 длинного плеча 1 хромосомы и делеция локуса 11q22.3 ассоциированы со снижением экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG2* в процессе НАХТ, а нормальное состояние локуса с повышением экспрессии этих генов.

Второй регуляторный кластер связан с локусом 1q23.3, амплификации которого с наибольшей частотой встречается при снижении экспрессии генов *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC5* и *MVP*. Третий регуляторный кластер объединяет все изученные гены ABC-транспортеров, он связан с локусом, делеция которого с наибольшей частотой (в 63-74% случаев) встречалась при снижении экспрессии всех изученных генов ABC. Это локус 17q13.1, одним из основных генов которого является супрессор опухолевого роста *TP53*. Наконец, для каждого изученного гена ABC идентифицированы локусы, CNA которых сопряжены со снижением его экспрессии, а нормальное состояние с повышением экспрессии в процессе химиотерапии.

Очень интересным и важным моментом является то, что со снижением экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ сопряжены CNA, а не нормальное состояние локусов, за исключением гена *ABCC1*, для которого как раз нормальное состояние локусов 16p11.2 и 1p22.1 сопряжено со снижением его экспрессии (таблица 33). Это говорит о том, что снижение экспрессии ABC-транспортеров все-таки является aberrантным явлением, характерным именно для клинической опухоли.

Несмотря на интересные результаты, хромосомные аномалии все же не могут полностью объяснить все случаи снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ, и мы обратились к последнему из выдвинутых ранее предположений (см. введение к главе 4) о роли клональной эволюции опухоли, которая происходит под действием химиопрепаратов, в регуляции экспрессии ABC-транспортеров.

4.7 Клональная эволюция опухоли в процессе НАХТ и изменение экспрессии АВС-транспортеров

В этом разделе работы представлены данные по исследованию изменения опухолевых клонов в процессе НАХТ и изменения экспрессии АВС-транспортеров. В процессе НАХТ может происходить клональная эволюция опухоли, при которой происходит изменение опухолевых клонов (полным или частичным исчезновением или появлением новых клонов или пролиферации минорных клонов) под влиянием химиопрепаратов и изменение количества опухолевых клеток, экспрессирующих гены АВС, вследствие некроза, апоптоза, другой формы гибели или пролиферации.

Практически всем солидным опухолям, в том числе и РМЖ, свойственна внутриопухолевая гетерогенность, которая проявляется в неоднородности их морфологического строения, генетического ландшафта, экспрессионной вариабельностью. Основными механизмами формирования гетерогенности считают развитие генетических нарушений в опухолевых клетках и их воспроизведение [Nassar A., et al., 2010], которые приводят к возникновению опухолевых клонов, различающихся набором признаков [Fisher R., et al., 2013, Michor F., et al., 2010]. Соотношение разных клонов опухолевых клеток в пределах одной опухоли, обуславливает и индивидуальное разнообразие опухолей, которое проявляется в различии вариантов прогрессии, прогноза и чувствительности к терапии. Гетерогенная опухоль рассматривается как динамическая экосистема, клональный состав которой может меняться при химиотерапевтическом воздействии. Химиопрепараты, обладая мутагенным эффектом и воздействуя на опухолевые клетки, могут приводить к возникновению генетических нарушений и новых опухолевых клонов [Bhatia S., et al., 2012, Greaves M., et al., 2012, Shibata D., 2012, Swanton C., 2012].

Для опухолей молочной железы описано внутриопухолевое кариотипическое разнообразие, аллельный имбаланс различной природы, а также наличие субпопуляций клеток с различной чувствительностью к терапии [Dexter D.L., et al., 1978, Fujii H., et al., 1996, Neppner G.H., et al., 1978]. Показана вариабельная экспрессия генов *TOP2a*, *c-myc*, *CyclinD1*, микроРНК, HER2, рецепторов к эстрогенам и прогестерону в пределах опухоли [Glockner S., et al., 2002, Nassar A., et al., 2010, Potts S.J., et al., 2012, Raychaudhuri M., et al., 2012, Seol H., et al., 2012, Вторушин С.В. 2011]. Установлена значительная внутриопухолевая генетическая гетерогенность метапластического и трижды-негативного РМЖ, наиболее агрессивных в прогностическом плане форм [Geyer F.C., et al., 2010, Patani N., et al., 2011].

Различные опухолевые клоны РМЖ могут характеризоваться специфическими структурными хромосомными и числовыми aberrациями, присутствием псевдодиплоидных и анеуплоидных клеточных популяций, которые образовались в результате одного или нескольких циклов клональной экспансии [Navin N., et al., 2011, Ng C.K., et al., 2012]. Исходя из таких данных, для исследования клональной эволюции опухоли необходим инструмент, который позволяет видеть одновременно весь спектр мутантных опухолевых клонов. Как нельзя лучше для этого подходят ДНК микрочипы, которые как раз и позволяют с чувствительностью 5% видеть одновременно весь генетический ландшафт опухоли.

Микроматрица CytoScan HD Array является уникальным инструментом для исследований опухолевых клонов, поскольку позволяет не только видеть одновременно весь спектр хромосомных нарушений во всех опухолевых клонах, но и производить количественный анализ статуса числа копий (CNstate) каждой мозаичной хромосомной aberrации, которая фактически говорит о представленности (в %) мутантного клона с данной аномалией на фоне нормальной ДНК опухолевой стромы и других мутантных клонов, без данной аномалии. Фактически, CNstate отражает соотношение опухолевой паренхимы и стромы в опухолевой ткани молочной железы.

Для исследования клональной эволюции опухоли молочной железы в процессе НАХТ из числа пациентов случайным образом были отобраны 26 больных, у которых микроматричный анализ был проведен не только в биопсийном образце до лечения, но и в операционном материале после проведения НАХТ.

Для характеристики изменения опухолевых клонов в процессе НАХТ оперировали несколькими видами данных. Во-первых, сравнивали до лечения и после НАХТ у каждого больного количество цитобэндов с CNA (амплификациями и делециями) и вычисляли изменения частоты CNA в процессе НАХТ = $(\text{число CNA до лечения} - \text{число CNA после НАХТ}) / (\text{число CNA до лечения}) * 100\%$, точно также вычисляли и изменение частоты делеций и амплификаций. Соответственно, положительное значение говорило об элиминации CNA в процессе НАХТ, отрицательное – о появлении новых CNA. Во-вторых, на основе суммарного для всех мозаичных aberrаций значения CNstate до лечения и после НАХТ в каждой опухоли рассчитывали изменения опухолевой паренхимы CNstate $(\text{CNstate до лечения} - \text{CNstate после НАХТ}) / (\text{CNstate до лечения}) * 100\%$. Отрицательное значение свидетельствовало о повышении паренхиматозно-стромального соотношения в опухоли и увеличении представленности опухолевой стромы, положительное значение – о снижении соотношения опухолевой паренхимы и стромы и элиминации опухолевых клеток. В-третьих, учитывая уникальное

значение CNstate для каждой мутации, подсчитали число мутантных клонов в каждой опухоли до лечения и после НАХТ, которые отражают процесс клональной эволюции опухоли в процессе НАХТ. На основе числа мутантных клонов рассчитывали изменение числа мутантных клонов в опухоли при проведении НАХТ (число мутантных клонов до лечения – число мутантных клонов после НАХТ)/(число мутантных клонов до лечения)*100%. Отрицательное значение индекса свидетельствовало о появлении новых клонов, положительное значение говорило об элиминации мутантных клонов в процессе НАХТ. Наконец, был проведен морфологический анализ соотношения стромальных и паренхиматозных компонентов в опухоли до лечения и после НАХТ. В таблице 35 представлено изменение частоты CNA, опухолевой паренхимы CNstate и числа мутантных клонов опухоли в процессе НАХТ у каждого из обследованных больных индивидуально, эффективность НАХТ и исход заболевания.

Установлено, что изменение частоты CNA и опухолевой паренхимы CNstate, количество мутантных клонов в опухоли до лечения и изменение числа мутантных клонов прямо коррелируют с эффективностью НАХТ по данным УЗИ и маммографии (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,54-0,72$, $p < 0,05$). Тем не менее, процент уменьшения первичного опухолевого узла после НАХТ по данным УЗИ, изменение опухолевой паренхимы CNstate и изменение числа мутантных клонов не всегда совпадает. В таблице 35 желтым цветом выделены данные, когда эффективность НАХТ, измеренная по объему опухоли при помощи УЗИ, кардинально отличается от изменения опухолевой паренхимы CNstate и числа мутантных клонов. У больной Б1 по данным УЗИ наблюдается стабилизация, тогда как CNstate показывает мощное прогрессирование опухоли сочетающееся с огромным ростом числа мутантных клонов после НАХТ. У больной Б2 по данным УЗИ отмечено значительное сокращение объема опухолевого узла (частичная регрессия), однако нет элиминации мутаций и мутантной ДНК, более того появляются пять новых мутантных клонов и изменение числа мутантных клонов отрицательное. По данным ультразвукового исследования у больной К3 эффект НАХТ равен нулю, однако отмечено 57% сокращение опухолевой паренхимы CNstate. Кроме того, у этой больной в процессе НАХТ почти в три раза сокращается число мутантных клонов в опухоли и индекс изменения числа мутантных клонов равен 63,6%. Наконец, у больных Н1 и П1 по данным УЗИ достигается 57% и 67% снижение объема опухолевого узла в процессе НАХТ, однако не происходит практически никакого изменения частоты CNA, опухолевой паренхимы CNstate, не изменяется количество мутантных клонов, а индекс изменения числа мутантных клонов близок к нулю (таблица 35).

Таблица 35. – Изменение мутантных клонов опухоли молочной железы в процессе НАХТ и эффективность лечения

Больная	Изменение частоты CNA	Изменение опухолевой паренхимы CNstate	Количество мутантных клонов		Изменение числа мутантных клонов, %	Эффект НАХТ		Наличие метастазов
			До лечения	После НАХТ		%	ВОЗ	
Б1	-860,0	-788,9	6	24	-300,0	-4	Стаб	Нет
Б2	0,0	-5,8	15	20	-33,3	74	ЧР	Есть
В1	66,2	43,3	46	43	6,5	79	ЧР	Нет
В2	90,9	83,9	9	7	22,2	73	ЧР	Нет
Г1	0,4	-3,2	21	20	4,8	7	Стаб	Нет
Г2	0,0	-4,8	6	5	16,7	10	Стаб	Нет
Е1	10,5	4,9	7	9	-28,6	-66	Прог	Есть
Ж1	51,4	51,4	40	25	37,5	75	ЧР	Нет
К1	55,2	40,9	46	31	32,6	98	ЧР	Нет
К2	0,0	0,0	0	0	0,0	18	Стаб	Нет
К3	55,0	57,4	11	4	63,6	0	Стаб	Нет
Л1	58,7	74,5	13	5	61,5	58	ЧР	Нет
Л2	-22,2	-65,1	24	25	-4,2	-28	Прог	Есть
М1	50,3	43,2	31	15	51,6	83	ЧР	Нет
М2	0,0	-44,9	2	2	0,0	18	Стаб	Нет
М3	98,8	93,3	33	3	90,9	76	ЧР	Нет
Н1	0,0	0,0	10	10	0,0	57	ЧР	Нет
П1	0,0	2,3	55	54	1,8	67	ЧР	Нет
С1	99,8	99,9	62	1	98,4	63	ЧР	Нет
С2	-9,4	-58,7	32	42	-31,3	-5	Стаб	Есть
С3	-47,6	-125,6	11	20	-81,8	-35	Прог	Есть
С4	67,1	62,3	20	18	10,0	78	ЧР	Нет
Ч1	14,7	33,3	24	19	20,8	49	Стаб	Нет
Ш1	28,1	33,7	33	30	9,1	71	ЧР	Нет
Ш2	25,9	13,3	6	5	16,7	43	Стаб	Нет
Ю1	51,6	65,1	23	16	30,4	59	ЧР	Нет

Примечание: Прог – прогрессирование, Стаб – стабилизация, ЧР – частичная регрессия, Желтым цветом выделены больные, данные по индексам которых, кардинально не совпадают с изменением объема опухоли, красным шрифтом выделены отрицательные значения индекса изменения числа мутантных клонов и наличие отдаленного метастазирования.

Таким образом, в большинстве случаев изменение частоты CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов в процессе НАХТ хорошо сочетается с изменением объема опухолевого узла в ответ на химиотерапию. Объем опухоли, несомненно, является важным показателем, который определяет возможность проведения органосохранной операции, но слабо связан с прогнозом заболевания, поскольку выживаемость больных со стабилизацией и частичной регрессией практически не различается [Wolmark N., et al., 2001]. По нашему мнению, изменение частоты CNA, изменение опухолевой паренхимы CNstate и числа мутантных клонов в качестве дополнительного критерия также хорошо

может использоваться для оценки эффективности НАХТ, можно сказать, генетической эффективности НАХТ.

В настоящее время описано два типа внутриопухолевой генетической гетерогенности инвазивного протокового РМЖ: моногеномный тип, обусловленный наличием мажорного клона в опухоли, и полигеномный, связанный с представленностью нескольких субклонов, занимающие одинаковые или различные опухолевые ниши [Navin N., et al., 2010]. Исходя из этого, в нашей выборке нет больных с моногеномным типом, минимальное количество мутантных клонов – 2 отмечалось у больной М2 (таблица 35). Эта больная плохо отвечала на НАХТ. Если условно выделить еще один тип – олигогеномный, с малым (скажем, до 10) количеством мутантных клонов, то окажется, что олигогеномные больные (Б1, В2, Г2, Е1, К2, М2, Н1, Ш2) плохо отвечают на НАХТ. У всех этих больных, за исключением Н1, отмечается стабилизация или прогрессирование. В то время как полигеномные опухоли в 67% случаев отвечали на НАХТ (у 12 из 18 частичная регрессия) (таблица 35). Это во многом опровергает бытующее мнение о том, что гетерогенные опухоли плохо поддаются лечению, а гетерогенность является маркером плохого ответа на химиотерапию [Marusyk A., et al., 2012, Tian T., et al., 2011].

Помимо объема опухоли (по УЗИ) данные по изменению частоты СНА, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов хорошо согласуются с результатами морфологического исследования. На рисунке 32 показаны микрофотографии опухоли до лечения и после НАХТ больной Л2 (рисунок 32 А и Б) и больной С1 (рисунок 32 В и Г). На рисунке хорошо видно, что у больной С1 происходит значительное сокращение представленности паренхиматозного компонента опухоли в процессе НАХТ. По данным морфологического исследования содержание паренхиматозного компонента в опухоли больной С1 уменьшается более чем в два раза с 80% до 35%, в то время как у больной Л1 никакого уменьшения опухолевой паренхимы в процессе НАХТ не происходит. Это соответствует данным по этим больным, представленным в таблице 35.

Можно предположить, что использование микроматричного исследования не только перед проведением НАХТ, но и на этапах НАХТ может оказаться весьма полезным с нескольких принципиальных позиций:

1. При помощи этого исследования можно ответить на вопрос о необходимости продолжения курсов химиотерапии, если происходит элиминация мутантных клонов и не происходит появление новых клонов. Решить вопрос замены схемы, если новые клоны в процессе терапии появляются.
2. Может быть решен вопрос о проведении адъювантной химиотерапии при появлении новых мутантных клонов.

3. При помощи микрочиповых исследований может количественно и качественно оцениваться эффективность НАХТ. Хотя на современном этапе это достаточно дорого, но имеется четкая тенденция к снижению стоимости микроматричных исследований, которые вполне могут стать рутинными.

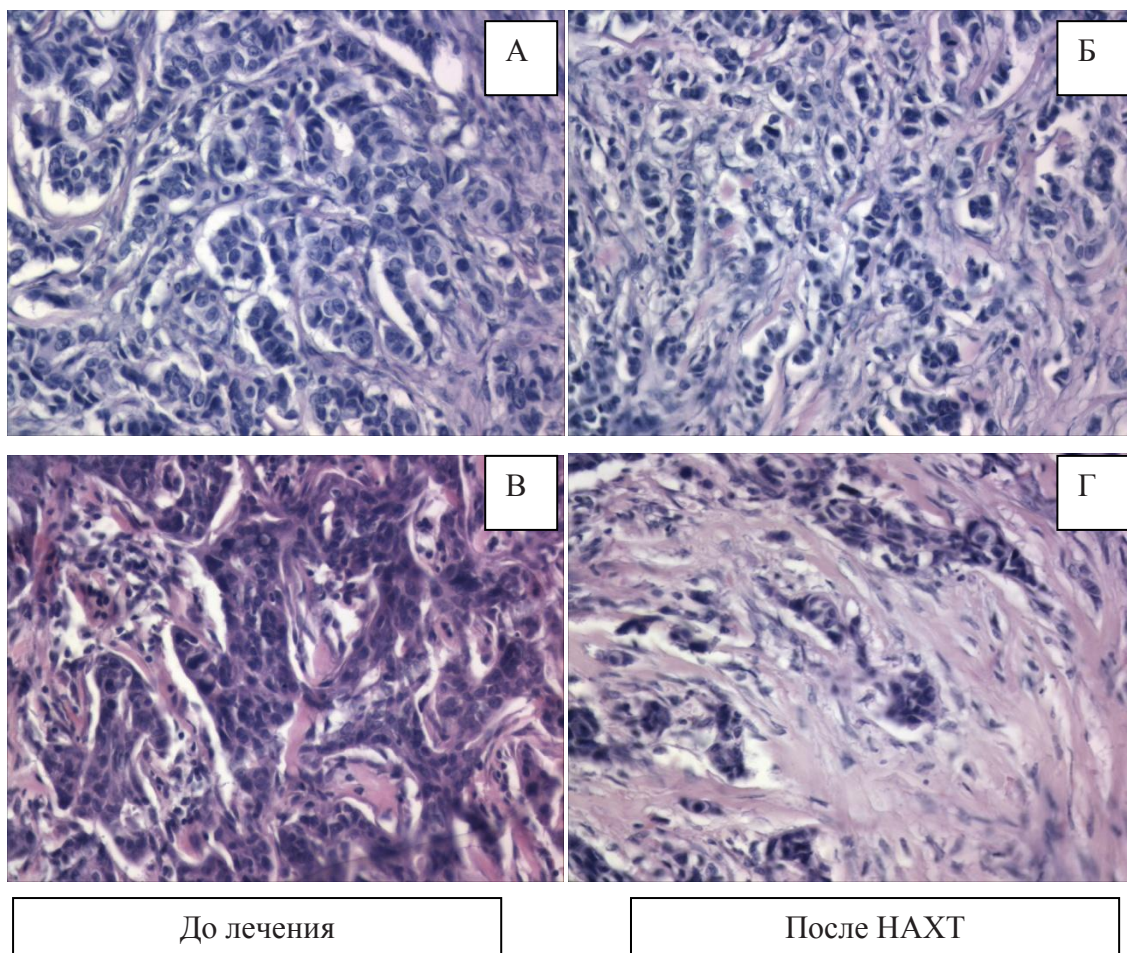


Рисунок 32. – Микрофотографии опухоли больной Л2 (А и Б) и больной С1 (В и Г) до лечения и после НАХТ. Окраска гематоксилином 200х

В отличие от объема опухоли, изменение частоты CNA, опухолевой паренхимы CNstate и изменения числа мутантных клонов отражают истинное влияние химиотерапии на опухоль, и в этом они подобны лекарственному патоморфозу. Однако лекарственный патоморфоз является качественным признаком с большой долей субъективности (человеческий фактор) и большинство пациентов имеют 2 степень патоморфоза, которая является не определенной в отношении прогноза. Изменение частоты CNA, изменение опухолевой стромы CNstate и числа мутантных клонов показывают, как в процессе химиотерапии меняется генетический ландшафт опухоли. Очень важным является связь этих изменений и особенно числа мутантных клонов, с прогнозом заболевания. При отрицательном значении индекса изменения числа мутантных клонов (т.е. при появлении новых мутантных клонов – рисунок 33 на нем показано появление новых мутантных

опухолевых клонов у конкретной больной в процессе НАХТ) в 83% (5/6) наблюдается отдаленные метастазы (таблица 35, выделено красным), в то время как при положительном или нулевом значении ни у одного не было гематогенных метастазов. На рисунке 34 приведены кривые дожития, построенные по методу Каплана-Майера. Положительное значение индекса изменения числа мутантных клонов с высоким уровнем доверительной вероятности ($p = 0,00001$), вычисленной по лог-ранговому тесту, является благоприятным прогностическим фактором.

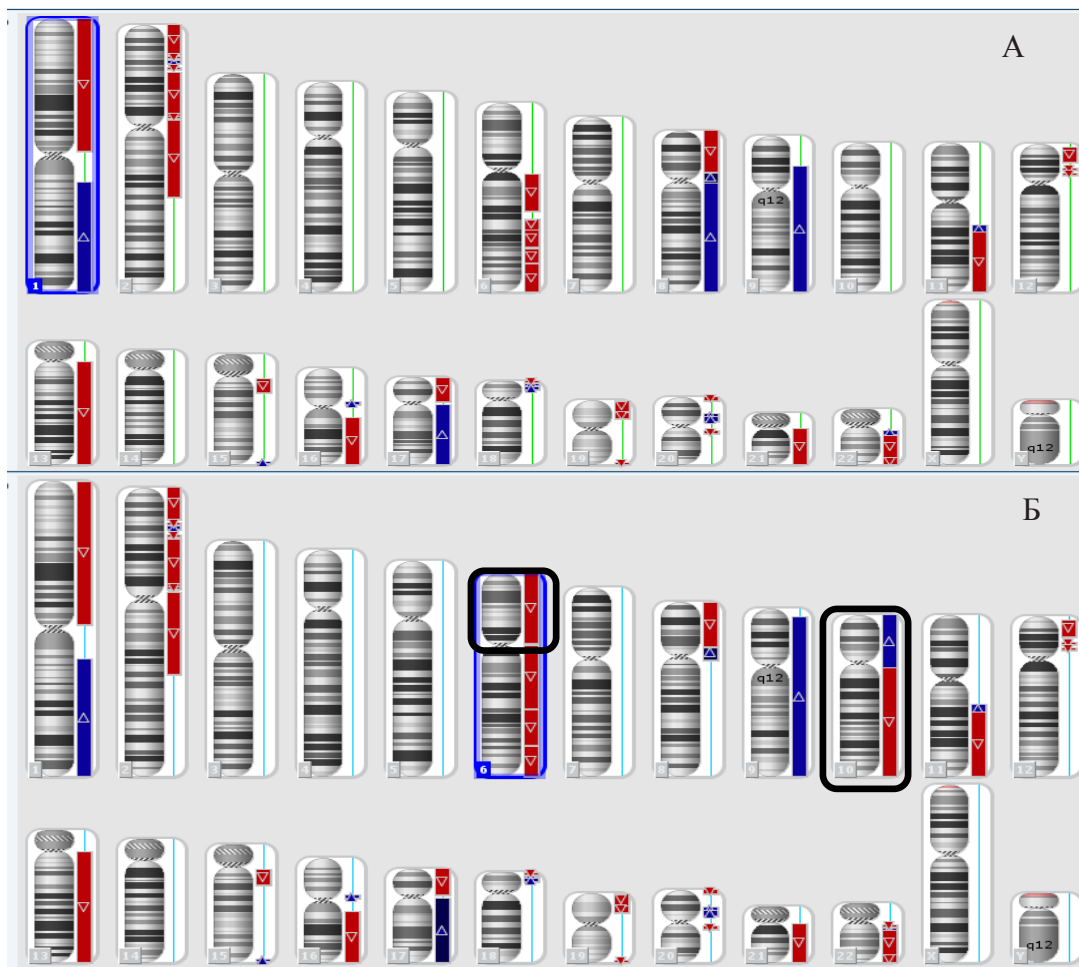


Рисунок 33. – Хромосомные аномалии в опухоли больной БЗ до лечения (А) и после НАХТ (Б) Выделено появление новых аномалий в коротком плече 6 хромосомы и в 10 хромосоме.

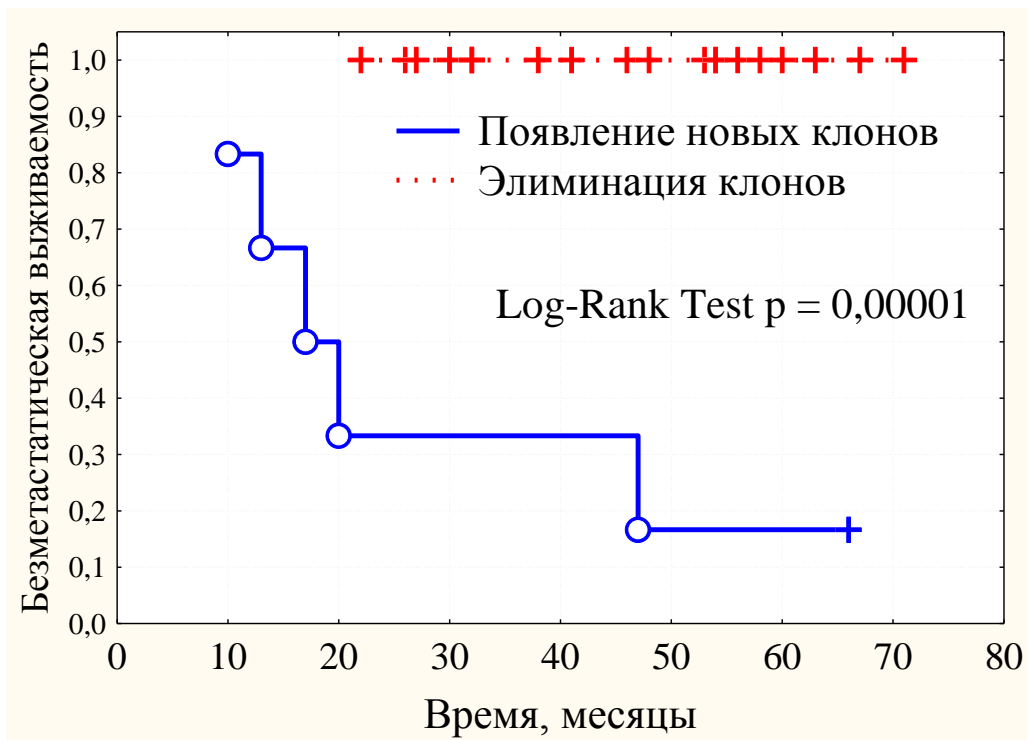


Рисунок 34. – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от появления или элиминации мутантных опухолевых клонов в процессе НАХТ.

Биологическая сущность феномена зависимости безметастатической выживаемости больных РМЖ от изменения числа мутантных клонов состоит в том, что при отрицательном значении индекса в опухоли больных в процессе НАХТ наблюдается «образование» новых метастатических клонов, при положительном значении новые клоны не образуются, а наоборот, происходит их элиминация или химиотерапия не оказывает никакого действия. Это и является отражением клональной эволюции опухоли. Важно отметить, что в данном случае термин «образование» новых клонов взят в кавычки, поскольку детекция новых клонов в опухоли после НАХТ при помощи микроматрицы может быть связана не с истинным их появлением, а с размножением минорных клонов, содержание которых в опухоли до лечения было менее 5%, т.е. ниже порога чувствительности микроматрицы. Это отчасти подтверждают результаты нескольких исследований, в которых показано, что опухолевые клетки рецидива являются потомками минорных субпопуляций первичной опухоли, выживших после химиотерапии [Keats J.J., et al., 2012, Mullighan C.G., et al., 2008, Ng C.K., et al., 2012]. Количественная оценка клеточного разнообразия может выступать в роли маркера прогноза и ответа на терапию РМЖ [Park S.Y., et al., 2010]. В пользу истинного образования новых мутантных клонов говорит то обстоятельство, что химиотерапия может выступать в качестве направляющего фактора эволюции клонального разнообразия опухоли.

Мы предполагаем, что размножившиеся или образовавшиеся *de novo* мутантные опухолевые клоны и являются теми клонами, которые выходят в кровеносное русло и осуществляют отдаленное метастазирование. Этот вопрос требует дальнейшего исследования, которое выходит за рамки настоящей работы.

Согласно модели последовательной прогрессии, метастазирующие клоны происходят из первичного опухолевого очага в ходе последовательной эволюции. Приобретение клеткой метастатического потенциала является заключительной стадией опухолевого процесса, и метастазы рассматриваются как наиболее злокачественные и агрессивные клоны клеток, которые могут доминировать в первичной опухоли или же метастазирование может быть инициировано редким опухолевым субклоном, который активируется в процессе развития опухоли или в процессе ее лечения [Fisher R., et al., 2013, Marusyk A., et al., 2012]. В этом случае появляющиеся мутантные клоны должны иметь сходные генетические нарушения, т.к. конечный метастатический фенотип должен быть детерминирован. По нашим данным из пяти больных с метастазами, у которых появлялись новые мутантные клоны, не было ни одной мозаичной мутации, которая появилась бы в опухоли всех этих больных в процессе НАХТ и была бы у всех этих больных. Более того, наши данные в определенной мере опровергают и стохастическую модель метастазирования, предполагающую что появление метастазов носит случайный характер, а их вероятность пропорциональна количеству клеток в опухоли [Новик А.В., и др., 2007]. В таблице 35 видно, что появление новых мутантных клонов не пропорционально количеству мутантных клонов в опухоли и не пропорционально представленности опухолевой паренхимы (последние данные не представлены), кроме того у 4/5 больных с метастазами размер опухоли составляет T₂ (от 2 до 5 см) и только у одной больной размер опухоли более 5 см в диаметре (T₃). Скорее всего, экспансия новых мутантных клонов действительно носит случайный характер, но не зависит от количества клеток в опухоли. Она может определяться условиями микроокружения, которые обеспечивают адаптацию тех или иных клонов в соответствии с генетическими свойствами этих клеток. В случаях гетерогенных опухолей клинически эффективная на первых этапах химио- или таргетная терапия может уничтожать доминантные опухолевые субклоны, в то же время в некоторых случаях может способствовать освобождению пространства, пролиферации минорных резистентных субпопуляций и/или дальнейшей клональной эволюции, в условиях соответствующего микроокружения, приводящей к опухолевой прогрессии.

На следующем этапе было проведено исследование роли клональной эволюции опухоли в регуляции экспрессии генов ABC-транспортёров. Изменение частоты CNA и

опухолевой паренхимы CNstate соотнесли с уровнем экспрессии ABC-транспортеров в бинарных образцах опухоли. Кроме того, изменение частоты амплификаций, делеций, изменение частоты CNA, опухолевой паренхимы CNstate и числа мутантных клонов соотнесли с частотой повышения или снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Представлялось важным ответить на несколько вопросов: сопряжено и всегда ли сопряжено снижение экспрессии генов МЛУ в процессе НАХТ с уменьшением содержания опухолевой ДНК в пост-НАХТ образцах, с изменением числа опухолевых клонов, с уменьшением содержания опухолевой паренхимы и изменением частоты хромосомных aberrаций (CNA). В таблице 36 представлен уровень экспрессии генов МЛУ в опухоли до лечения и после НАХТ в зависимости от увеличения или уменьшения опухолевой паренхимы CNstate и изменения числа мутантных клонов.

Статистически значимых различий между группами с увеличением и уменьшением опухолевой паренхимы и числом мутантных клонов не установлено. Имеются только тенденции: уровень экспрессии *ABCB1* до лечения в опухоли больных с уменьшением опухолевой паренхимы CNstate значительно выше, чем у больных с увеличением (или отсутствием изменений) опухолевой паренхимы; экспрессия гена *ABCG2* после НАХТ, у больных с уменьшением числа мутантных клонов в процессе НАХТ ниже, чем у больных с повышением числа мутантных клонов; диаметрально противоположная ситуация для экспрессии гена *ABCG1* после НАХТ (таблица 36).

Таким образом, только уровень экспрессии гена *ABCG2* после НАХТ ниже у больных с уменьшением количества мутантных клонов, чем у больных с отсутствием изменений или с образованием *de novo* мутантных клонов в процессе НАХТ.

Отдельно была проанализирована частота повышения и снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ в зависимости от уменьшения или увеличения частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов (таблица 37). В связи с малой численностью исследованной выборки учитывались значения *p value* на уровне тенденции $< 0,1$. Повышение экспрессии основного гена лекарственной устойчивости *ABCB1* в 75% случаев (9 из 12) обусловлено увеличением частоты амплификаций (но не делеций) в процессе НАХТ, в 80% случаев определяется увеличением опухолевой паренхимы и повышением числа мутантных клонов в 78% случаев, а снижение экспрессии гена *ABCB1* обусловлено уменьшением числа мутантных клонов (65% случаев), уменьшением опухолевой паренхимы (в 69%) и/или уменьшением частоты амплификаций в процессе НАХТ (71% случаев).

Таблица 36. – Экспрессия генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ в зависимости от изменения опухолевой паренхимы CNstate и числа мутантных клонов

Гены	Точка	Изменение опухолевой паренхимы CNstate			Изменения числа опухолевых клонов		
		↑или0	↓	p-value	↑или0	↓	p-value
<i>ABCB1</i>	До	1,71±1,04	5,77±1,59	0,089	4,08±2,16	4,38±1,37	0,799
	После	3,56±2,29	4,85±1,52	0,651	7,19±3,55	3,50±1,21	0,339
<i>ABCB3</i>	До	0,64±0,18	1,14±0,38	0,698	0,45±0,15	1,12±0,32	0,243
	После	0,74±0,25	0,53±0,11	0,493	0,51±0,32	0,64±0,11	0,368
<i>ABCC1</i>	До	1,53±1,13	1,28±0,31	0,213	2,75±1,67	0,93±0,22	0,373
	После	2,17±1,39	1,01±0,24	0,821	3,51±2,01	0,77±0,11	0,203
<i>ABCC2</i>	До	1,59±0,80	4,95±2,03	0,533	5,87±4,36	3,07±1,20	0,899
	После	2,78±1,34	5,20±3,22	0,497	11,37±8,32	2,11±0,75	0,279
<i>ABCC5</i>	До	1,46±0,47	2,78±0,64	0,199	1,94±0,67	2,40±0,56	1,0
	После	2,26±0,96	2,62±0,68	0,788	3,31±1,38	2,21±0,58	0,351
<i>ABCG1</i>	До	0,74±0,19	2,02±0,61	0,533	0,57±0,23	1,87±0,51	0,252
	После	0,83±0,31	1,44±0,44	0,462	0,35±0,12	1,49±0,38	0,056
<i>ABCG2</i>	До	1,56±0,78	2,33±0,75	0,821	2,84±1,33	1,81±0,60	0,373
	После	3,05±1,93	2,13±0,88	0,428	5,25±2,79	1,58±0,70	0,086
<i>MVP</i>	До	0,40±0,10	0,36±0,08	0,462	0,29±0,12	0,40±0,07	0,504
	После	0,81±0,31	0,62±0,29	0,213	1,54±0,82	0,42±0,07	0,525

Примечание: p-value – уровень доверительной вероятности по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни, полужирным курсивом выделены значения p-value на уровне тенденции <0,1

Снижение экспрессии гена *ABCB3* в процессе НАХТ связано с уменьшением частоты мутантной ДНК в 71% случаев (11 из 14) (отмечено при положительном индексе изменения CNA). Снижение экспрессии *ABCC1* обусловлено уменьшением содержания опухолевой паренхимы и в 56% случаев (9 из 16) наблюдается при положительном значении индекса изменения CNstate. В 65% случаев снижение экспрессии гена *ABCC2* связано с элиминацией мутантных клонов из опухоли в процессе НАХТ. В большинстве случаев (79%) экспрессия *ABCG1* снижается в процессе НАХТ, если под воздействием химиотерапии снижается частота амплификаций в опухоли, это соотномится с данными по гену *ABCB1* (таблица 37). Кроме изменения частоты амплификаций в опухоли под действием химиотерапии снижение экспрессии гена *ABCG1* в 75% случаев (12 из 16) зависит от уменьшения опухолевой паренхимы в процессе НАХТ. *ABCG2* является последним из исследованных генов, снижение экспрессии которого в процессе НАХТ зависит от изменения частоты CNA в 73% случаев, от уменьшения опухолевой паренхимы в 69% случаев и в 65% случаев от элиминации мутантных клонов под действием химиопрепаратов.

Таблица 37. – Изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ в зависимости от изменений частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов.

	Изменение частоты амплификаций		Изменение частоты делеций		Изменение частоты CNA		Изменение опухолевой паренхимы CNstate		Изменение числа мутантных клонов	
	↑или0	↓	↑или0	↓	↑или0	↓	↑или0	↓	↑или0	↓
<i>ABCB1</i>	9/3 (75/25)	4/10 (29/71)	7/3 (70/30)	6/10 (38/62)	8/3 (73/27)	5/10 (33/67)	8/2 (80/20)	5/11 (31/69)	7/2 (28/72)	6/11 (35/65)
p-value	0,024		0,113		0,055		0,021		0,048	
<i>ABCB3</i>	7/5 (58/42)	4/10 (29/71)	6/4 (60/40)	5/11 (31/69)	7/4 (64/36)	4/11 (27/73)	6/4 (60/40)	5/11 (31/69)	4/5 (44/56)	7/10 (41/59)
p-value	0,129		0,150		0,069		0,150		0,598	
<i>ABCC1</i>	9/3 (75/25)	6/8 (43/57)	7/3 (70/30)	8/8 (50/50)	8/3 (73/27)	7/8 (47/53)	8/2 (80/20)	7/9 (44/56)	7/2 (28/22)	8/9 (47/53)
p-value	0,104		0,278		0,178		0,078		0,138	
<i>ABCC2</i>	8/4 (67/33)	5/9 (36/64)	7/3 (70/30)	6/10 (38/62)	7/4 (64/36)	6/9 (40/60)	7/3 (70/30)	6/10 (38/62)	7/2 (28/72)	6/11 (35/65)
p-value	0,119		0,113		0,214		0,113		0,048	
<i>ABCC5</i>	7/5 (58/42)	7/7 (50/50)	6/4 (60/40)	8/8 (50/50)	7/4 (64/36)	7/8 (47/53)	6/4 (60/40)	8/8 (50/50)	5/4 (56/44)	9/8 (53/47)
p-value	0,488		0,464		0,324		0,464		0,613	
<i>ABCG1</i>	8/4 (67/33)	3/11 (21/79)	5/5 (50/50)	6/10 (38/62)	6/5 (54/46)	5/10 (33/67)	6/4 (60/40)	4/12 (25/75)	5/4 (56/44)	6/11 (35/65)
p-value	0,026		0,412		0,248		0,086		0,281	
<i>ABCG2</i>	9/3 (75/25)	4/10 (29/71)	7/3 (70/30)	6/10 (38/62)	8/3 (73/27)	5/10 (33/67)	8/2 (80/20)	5/11 (31/69)	7/2 (28/22)	6/11 (35/65)
p-value	0,024		0,113		0,055		0,021		0,048	
<i>MVP</i>	6/6 (50/50)	6/8 (43/57)	5/5 (50/50)	7/9 (44/56)	6/5 (54/46)	6/9 (40/60)	6/4 (60/40)	6/10 (38/62)	5/4 (56/44)	7/10 (41/59)
p-value	0,512		0,536		0,388		0,237		0,387	

Примечание: в таблице представлено количество и частота (%) случаев повышения/снижения экспрессии генов ABC. p-value – уровень доверительной вероятности по критерию Фишера, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия, полужирным курсивом выделены значения p-value на уровне тенденции <0,1

В таблице 38 представлен анализ обратной зависимости изменений частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов от изменения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Результаты хорошо согласуются с представленными выше. В 73 – 85% случаев при снижении экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG1* и *ABCG2* наблюдается уменьшение частоты амплификаций, делеций, CNA, сокращение опухолевой паренхимы и/или уменьшение числа мутантных клонов. Для остальных генов связь не установлена.

Таблица 38. – Изменение частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов в зависимости от изменения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ.

Гены	Изменение экспрессии	Изменение частоты амплификаций	Изменение частоты Делеций	Изменение частоты CNA	Изменение опухолевой паренхимы CNstate	Изменение числа мутантных клонов
<i>ABCB1</i>	Повышение	9/4 (69/31)	7/6 (54/46)	7/6 (54/46)	8/5 (62/38)	8/5 (62/38)
	Снижение	3/10 (23/77)	3/10 (23/77)	3/10 (23/77)	2/11 (15/85)	2/11 (15/85)
p-value		0,024	0,113	0,113	0,021	0,021
<i>ABCB3</i>	Повышение	6/4 (60/40)	5/5 (50/50)	5/5 (50/50)	6/4 (60/40)	6/4 (60/40)
	Снижение	6/10 (38/62)	5/11 (31/69)	5/11 (31/69)	4/12 (25/75)	4/12 (25/75)
p-value		0,238	0,293	0,293	0,086	0,086
<i>ABCC1</i>	Повышение	9/6 (60/40)	7/8 (47/53)	7/8 (47/53)	8/7 (53/47)	8/7 (53/47)
	Снижение	3/8 (27/73)	3/8 (27/73)	3/8 (27/73)	2/9 (18/82)	2/9 (18/82)
p-value		0,104	0,278	0,278	0,078	0,078
<i>ABCC2</i>	Повышение	8/5 (62/38)	7/6 (54/46)	7/6 (54/46)	7/6 (54/46)	7/6 (54/46)
	Снижение	4/9 (31/69)	3/10 (23/77)	3/10 (23/77)	3/10 (23/77)	3/10 (23/77)
p-value		0,119	0,113	0,113	0,113	0,113
<i>ABCC5</i>	Повышение	6/7 (46/54)	5/8 (38/62)	5/8 (38/62)	6/7 (46/54)	6/7 (46/64)
	Снижение	6/7 (46/54)	5/8 (38/62)	5/8 (38/62)	4/9 (31/69)	4/9 (31/69)
p-value		1,0	1,0	1,0	0,344	0,344
<i>ABCG1</i>	Повышение	8/3 (73/27)	5/6 (45/55)	5/6 (45/55)	6/5 (55/45)	6/5 (55/45)
	Снижение	4/11 (27/73)	5/10 (33/67)	5/10 (33/67)	4/11 (27/73)	4/11 (27/73)
p-value		0,026	0,412	0,412	0,150	0,150
<i>ABCG2</i>	Повышение	9/4 (69/31)	7/6 (54/46)	7/6 (54/46)	8/5 (62/38)	8/5 (62/38)
	Снижение	3/10 (23/77)	3/10 (23/77)	3/10 (23/77)	2/11 (15/85)	2/11 (15/85)
p-value		0,024	0,113	0,113	0,021	0,021
<i>MVP</i>	Повышение	6/6 (50/50)	5/7 (42/58)	5/7 (42/58)	6/6 (50/50)	6/6 (50/50)
	Снижение	6/8 (43/57)	5/9 (36/64)	5/9 (36/64)	4/10 (29/71)	4/10 (29/71)
p-value		0,512	0,189	0,189	0,237	0,237

Примечание: в таблице представлено количество и частота (%) случаев повышения экспрессии/уменьшения частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов соответственно. p-value – уровень доверительной вероятности по критерию Фишера, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия, полужирным курсивом выделены значения p-value на уровне тенденции <0,1

Таким образом, в 56-80% случаев при уменьшении под действием химиопрепаратов частоты амплификаций (но не делеций), CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов, наблюдается снижение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* и наоборот, при снижении экспрессии в 73-85% случаев отмечается элиминация опухолевых клеток. Это свидетельствует о тесной взаимосвязи, именно взаимосвязи, фактора снижения экспрессии генов лекарственной устойчивости в процессе НАХТ и элиминации опухолевых клеток под действием химиопрепаратов, которая выражается в сокращении мутантной ДНК. Наши результаты не подтверждают, но усложняют причинно-следственные связи выдвинутого в начале этого раздела предположения о том,

что снижение экспрессии генов ABC обусловлено уменьшением во время химиотерапии количества опухолевых клеток, экспрессирующих гены ABC вследствие некроза (апоптоза или другой формы гибели) клеток.

Снижение экспрессии генов *ABCC5* и *MVP* не взаимосвязано с элиминацией опухолевых клеток в процессе НАХТ и, по-видимому, обусловлено другими механизмами, что совпадает с меньшим значением снижения экспрессии данных генов для реализации эффекта НАХТ (таблица 10) и безметастатической выживаемости (таблица 15).

В предыдущем разделе было установлено, что одним из важных механизмов снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ является делеции их локусов. Мы проанализировали, всегда ли совпадает наличие делеции локуса гена ABC с уменьшением, под действием химиопрепаратов количества мутантной опухолевой ДНК (таблица 38). В 29 – 31% случаев при уменьшении частоты делеций, амплификаций и CNA в опухоли, уменьшении опухолевой паренхимы и уменьшении числа мутантных клонов, в опухоли не наблюдается делеций хотя бы одного из локусов генов ABC-транспортера. Кроме того, при отсутствии действия на опухолевые клоны химиопрепаратов или увеличении количества опухолевых клонов в 50% случаев отмечается делеция локуса хотя бы одного из исследованных генов ABC (таблица 38).

Таблица 38. – Частота делеций локусов генов ABC-транспортеров при изменении частот амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов.

	Изменение частоты амплификаций		Изменение частоты Делеций		Изменение частоты CNA		Изменение опухолевой паренхимы CNstate		Изменение числа мутантных клонов	
	↑или0	↓	↑или0	↓	↑или0	↓	↑или0	↓	↑или0	↓
Есть делеция генов ABC	6 (50%)	10 (71%)	5 (50%)	11 (69%)	5 (50%)	11 (69%)	5 (50%)	11 (69%)	5 (50%)	11 (69%)
Нет делеций генов ABC	6 (50%)	4 (29%)	5 (50%)	5 (31%)	5 (50%)	5 (31%)	5 (50%)	5 (31%)	5 (50%)	5 (31%)

Иначе говоря, есть случаи, когда экспрессия генов ABC снижается и наблюдается элиминация опухолевых клонов, но отсутствуют делеции генов МЛУ и наоборот, экспрессия генов ABC снижается при делеции и наблюдается отсутствие изменений или увеличение количества опухолевых клонов в процессе НАХТ. Это свидетельствует о том, что элиминация опухолевых клонов и делеция локусов ABC-транспортеров являются

независимыми механизмами, которые могут приводить к снижению экспрессии генов МЛУ самостоятельно. При элиминации опухолевых клонов и делециях локусов генов МЛУ эффективность снижения экспрессии генов значительно возрастает, и возрастает эффективность НАХТ. Ярким примером этому служит больная С1, у которой достигается 99% элиминация опухолевых клонов (таблица 35, рисунок 35 А и Б) в процессе НАХТ, практически полная нормализация ДНК (полная генетическая регрессия – рисунок 35 В) и резкое снижение экспрессии генов ABC при 4 делециях их локусов (рисунок 35 Г).

С другой стороны, из всех 26 обследованных только у больной Н1 отсутствуют всякие изменения в процессе НАХТ частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов (таблица 35, рисунок 36 А и Б). Кроме того, у этой больной нет делеций исследованных генов ABC-транспортеров, более того локусы практически всех генов ABC амплифицированы, тем не менее экспрессия всех генов лекарственной устойчивости (за исключением *ABCC1*) в процессе НАХТ снижается (рисунок 36 Г). Это наблюдение является уникальным и со всей ясностью свидетельствует о том, что, независимо от элиминации опухолевых клонов и делеции локусов генов ABC, существует еще один самостоятельный механизм, связанный со снижением экспрессии генов лекарственной устойчивости, который действует в ответ на химиотерапию. Очевидно, этот механизм обусловлен уникальными хромосомными аномалиями в опухоли больной Н1. Мы проанализировали какие существуют уникальные нарушения у больной Н1 и нет их у других обследованных больных. Оказалось, что единственным уникальным локусом, который амплифицирован только у больной Н1, является цитобэнд 3p12.3 (на рисунке 36 отмечен стрелкой).

Согласно базе данных GeneCards, в локусе содержится 57 генетических элементов, среди которых всего 7 кодирующих белки генов. Наибольший интерес представляет ген *DAP4* (death-associated protein 4C). Известно, что коэкспрессия *DAP4* и *MST1* увеличивает *MST1*-вызванный апоптоз. Однако, *DAP4* не фосфорилирует *MST1*, и не увеличивает активность *MST1* киназы. *DAP4* может увеличить апоптотический эффект посредством усиления caspase-катализируемого разложения *MST1*. Было показано, что *DAP4* является *MST1*-ассоциированным белком, который конститутивно экспрессируется в ядре. Сверхэкспрессия *DAP4* не начинает апоптоз, но существенно увеличивает степень апоптоза, индуцированного гиперэкспрессией *MST1*. *MST1*-индуцированный апоптоз частично зависит от p53; *DAP4* связывает p53 и *MST1*, стабилизируя их, и может действовать как p53-зависимый компонент *MST1*-индуцированного апоптоза [Lin Y., et al., 2002]. Возможно, высокая экспрессия *DAP4* у больной Н1 за счет амплификации его

локуса увеличивает стабильность продукта гена p53, известного негативного регулятора генов лекарственной устойчивости.

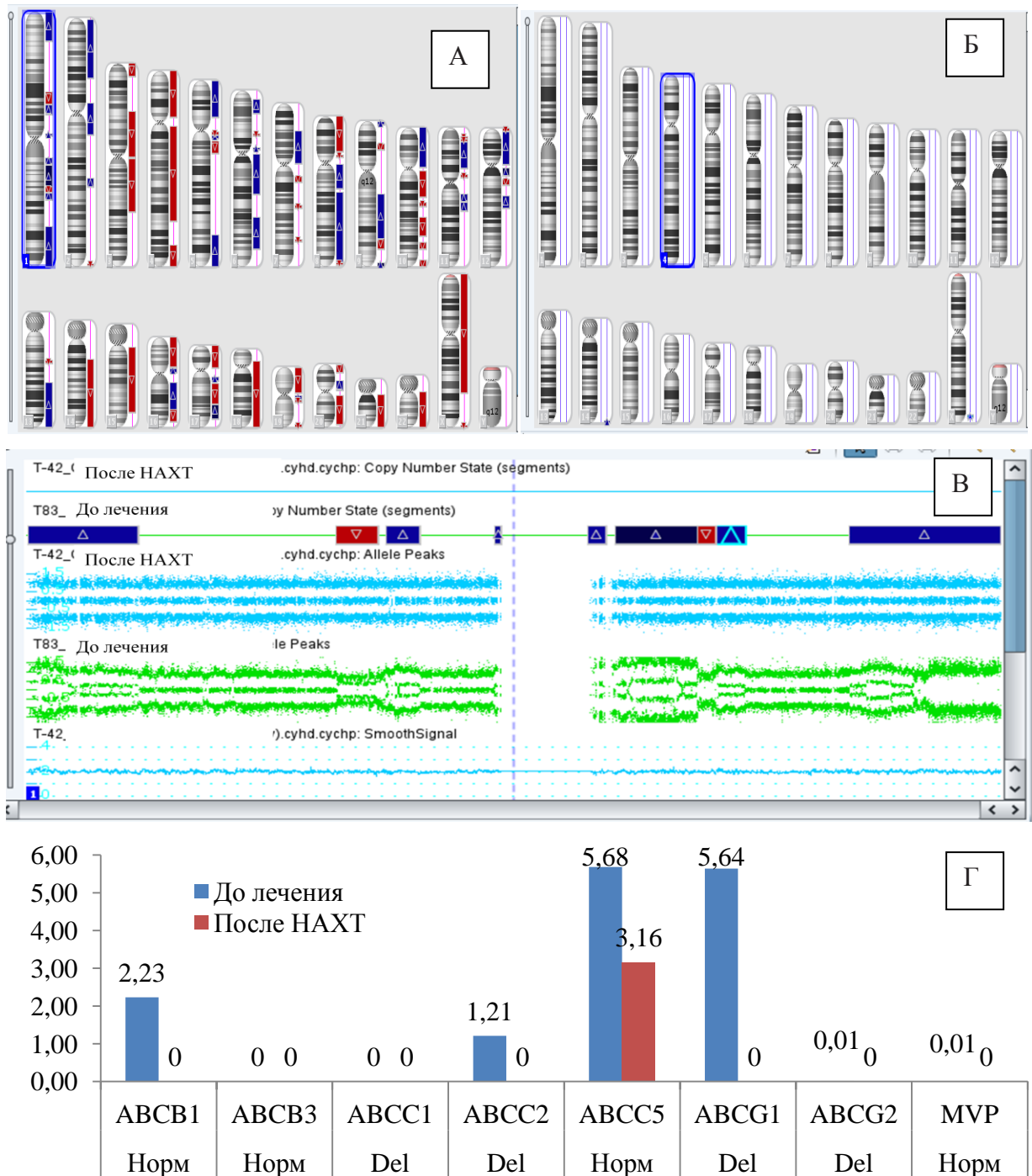


Рисунок 35. – Хромосомные aberrации и экспрессия генов МЛУ у больной С1 до лечения и после НАХТ.

До лечения (А) после НАХТ (Б) - хромосомные aberrации (синим цветом – амплификации, красным – делеции) в опухоли больной С1; В – аллельные полосы (Allele Peaks) 1 хромосомы больной С1 до лечения (зеленым цветом) и после НАХТ (голубым цветом), Нормальное состояние – 3 аллельных полосы; Г – экспрессия генов МЛУ до лечения и после НАХТ и состояние их локусов. Больная С1: Т₂№М₀, люминальный В тип, Эффект НАХТ – частичная регрессия 63%, 2 степень патоморфоза, Схема НАХТ - САХ 4 курса, метастазов нет, Общая выживаемость - 64 месяца.

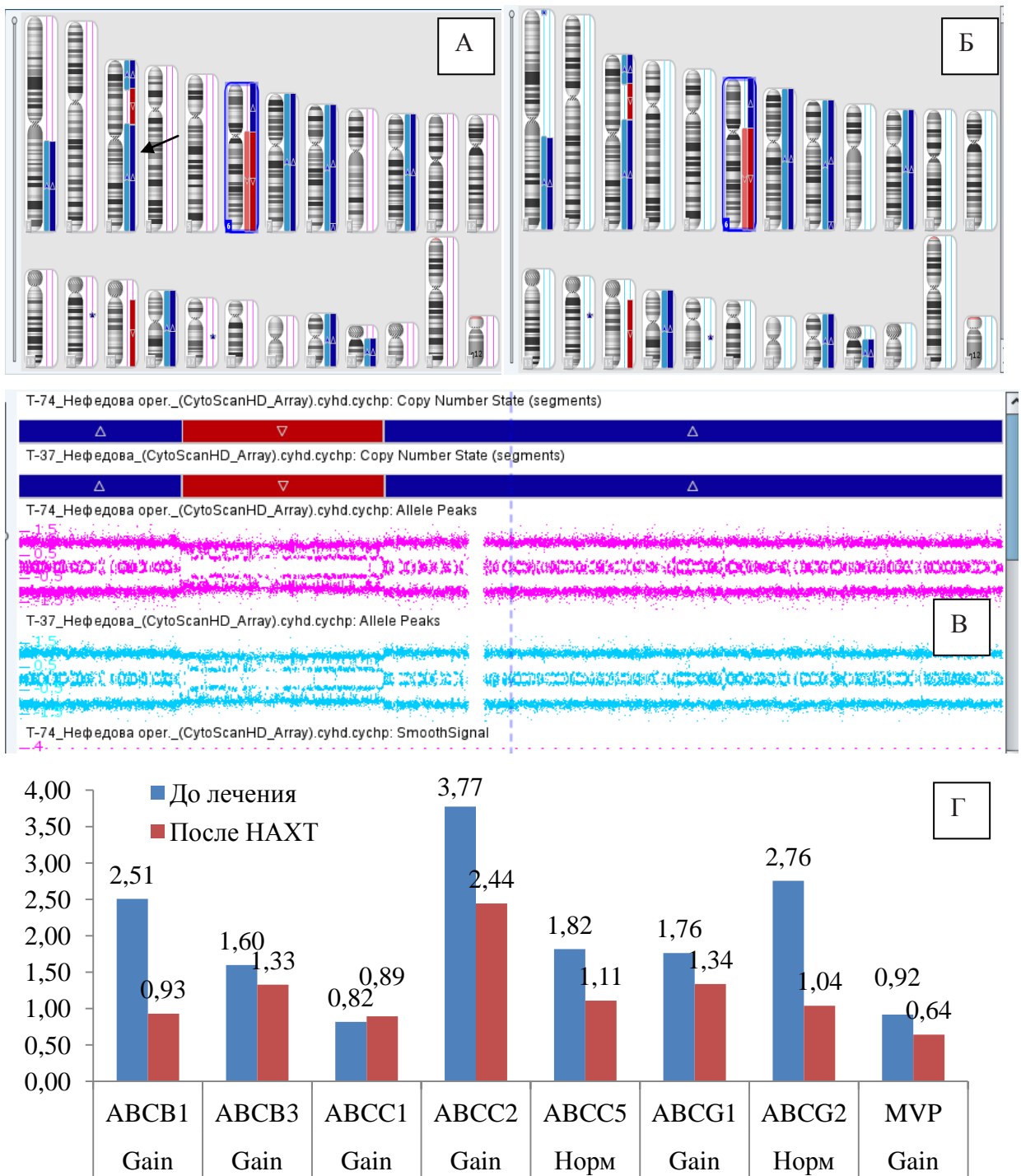


Рисунок 36. – Хромосомные aberrации и экспрессия генов МЛЮ у больной Н1 до лечения и после НАХТ.

До лечения (А) после НАХТ (Б) - хромосомные aberrации (синим цветом – амплификации, красным – делеции) в опухоли больной Н1; В – аллельные полосы (Allele Peaks) 2 хромосомы больной Н1 до лечения (лиловым цветом) и после НАХТ (голубым цветом), Нормальное состояние – 3 аллельных полосы; Г – экспрессия генов МЛЮ до лечения и после НАХТ и состояние их локусов.

Больная Н1: $T_2N_2M_0$, триждынегативный тип, Эффект НАХТ – частичная регрессия 57%, 2 степень патоморфоза, Схема НАХТ - FАC 4 курса, метастазов нет, Общая выживаемость -74 месяца

Таким образом, в результате исследований в этом разделе установлено, что изменение частоты CNA и опухолевой паренхимы CNstate, количество мутантных клонов в опухоли до лечения и изменение числа мутантных клонов прямо коррелируют с эффективностью НАХТ по данным УЗИ и маммографии (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,54-0,72$, $p < 0,05$), т.е. в большинстве случаев хорошо сочетается с изменением объема опухолевого узла в ответ на химиотерапию. В отличие от объема опухоли, который, в основном, определяет возможность проведения органосохранной операции, изменение частоты CNA, опухолевой паренхимы CNstate и изменения числа мутантных клонов отражают истинное влияние химиотерапии на опухоль. Установлено, что изменение числа мутантных клонов сильно связано с прогнозом заболевания. При появлении новых мутантных клонов в 83% (5/6) наблюдается отдаленные метастазы в то время как при сокращении числа мутантных клонов или отсутствие действия химиотерапии на опухоль ни у одного больного не отмечалось гематогенное метастазирование. Это дает основания предполагать, что изменение частоты CNA, изменение опухолевой паренхимы CNstate и числа мутантных клонов может служить в качестве дополнительного критерия для оценки эффективности НАХТ, можно сказать генетической эффективности НАХТ, которая отражает и количественные характеристики ответа опухоли и имеет высокое прогностическое значение.

Уровень экспрессии генов лекарственной устойчивости до лечения и после НАХТ слабо связан с изменением частоты CNA, изменением опухолевой паренхимы CNstate и числа мутантных клонов в процессе химиотерапии и только уровень экспрессии гена *ABCG2* после НАХТ ниже у больных с уменьшением количества мутантных клонов, чем у больных с отсутствием изменений или с образованием *de novo* мутантных клонов. Экспрессия генов МЛУ в опухоли до лечения не является причиной для уменьшения частоты CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов.

Установлена роль клональной эволюции опухоли молочной железы в регуляции экспрессии генов лекарственной устойчивости. Показано, что в 56-80% случаев при уменьшении под действием химиопрепаратов частоты амплификаций (но не делеций), CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов, наблюдается снижение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* и наоборот, при снижении экспрессии в 73-85% случаев отмечается элиминация опухолевых клеток. Эти данные свидетельствуют о тесном взаимодействии фактора снижения экспрессии генов лекарственной устойчивости в процессе НАХТ и элиминации опухолевых клеток под действием химиопрепаратов, которая выражается в сокращении мутантной ДНК. Что первично, в данном случае, снижение экспрессии или элиминация опухолевых клеток,

сказать нельзя. В данном случае это как спор о том, что первично курица или яйцо? Снижение экспрессии генов *ABCC5* и *MVP* не взаимосвязано с процессом элиминации опухолевых клеток под действием химиопрепаратов.

Сокращение опухолевых клонов в процессе НАХТ и делеция локусов ABC-транспортеров являются независимыми механизмами, которые самостоятельно могут приводить к снижению экспрессии генов лекарственной устойчивости. При элиминации опухолевых клонов и делециях локусов генов МЛУ эффективность снижения экспрессии генов значительно возрастает и возрастает эффективность НАХТ.

В процессе химиотерапии в опухоли если происходит элиминация мутантных опухолевых клонов то элиминируются прежде всего клоны, которые несут делеции генов ABC и хромосомные нарушения представленные в таблице 33. На рисунке 37 показана элиминация в процессе НАХТ опухолевых клонов несущих делеции локусов генов ABC и нарушения

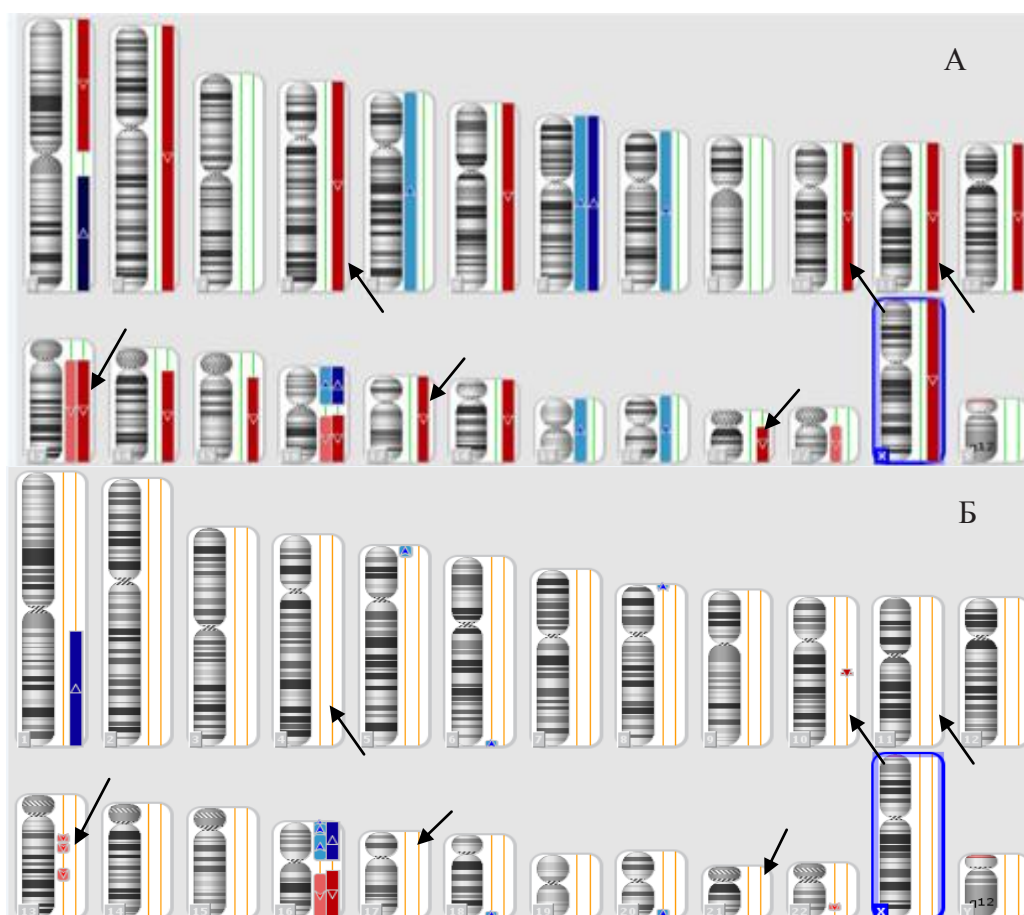


Рисунок 37. – Элиминация в процессе НАХТ у больной P2 мутантных опухолевых клонов несущих делеции локусов генов ABC (*ABCG2-4q22.1*, *ABCC2-10q24*, *ABCG1-21q22.3*) и хромосомные нарушения механизмов up-регуляции генов ABC (*del 11q22.3*, *del 13q14.2*, *del 17p13.1*). А – до лечения, Б – после НАХТ

На рисунке 38 представлен итог наших исследований, и приводятся предполагаемые, на основе полученных данных, факторы регуляции экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ, которые определяют вариабельность индивидуального ответа на НАХТ. В зависимости от состояния первичной опухоли события в процессе НАХТ может развиваться по трем возможным сценариям:

В первом варианте в опухолевых клетках благодаря небольшому количеству несбалансированных хромосомных аномалий сохраняются основные механизмы у-регуляции экспрессии ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты. В этом варианте сценария опухоль очень похожа на опухолевые клеточные модели, используемые *in vitro*. После начала НАХТ, опухолевые клетки отвечают повышением экспрессии ABC-транспортеров, в результате формируется фенотип адаптивной множественной лекарственной устойчивости. Опухолевые клетки практически не гибнут, опухолевая паренхима и число мутантных клонов увеличивается или практически не изменяется, даже, несмотря на возможное небольшое уменьшение объема опухоли. В результате опухоль не отвечает на НАХТ и у этих больных неблагоприятный прогноз, особенно, в случае увеличения числа мутантных клонов (безметастатическая выживаемость 17%).

Второй вариант является основным вариантом (95% случаев) развития событий, объясняющих феномен снижения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Опухолевые клетки еще до начала лечения, характеризуются высокой частотой несбалансированных хромосомных аномалий, которые приводят к значительным нарушениям в механизмах у-регуляции экспрессии генов ABC-транспортеров. Нами были идентифицированы ряд таких нарушений, прежде всего это делеции локусов генов ABC-транспортеров (3q27, 4q22.1, 6p21.32, 7q21.1, 10q24, 16p11.2, 16p13.1, 21q22.3), кроме того, это *amp* 1q23.3, *amp* 1q32.2, *amp* 1q44, *del* 11q22.3, *del* 13q14.2. Совершенно четко было показано, что при наличии делеции генов ABC-транспортеров в опухоли до лечения, опухолевые клоны с делециями генов ABC и *amp* 1q23.3, *amp* 1q32.2, *amp* 1q44, *del* 11q22.3, *del* 13q14.2 не сохраняются после НАХТ и элиминируются. Это приводит нас к выводу о том, что в начале курсов химиотерапии из опухоли элиминируются чувствительные опухолевые клоны с нарушениями у-регуляции, не отвечающие повышением экспрессии генов ABC-транспортеров и не формирующие адаптивную МЛУ. Происходит сокращение опухолевой паренхимы, числа мутантных клонов и в результате, в конце сеансов НАХТ, паренхиматозно-стромальное соотношение уменьшается. Учитывая, что экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости в нормальной ткани (и, по-видимому, и в строме) ниже, чем в опухолевой ткани уменьшение паренхиматозно-стромального соотношения будет приводить с низкой

суммарной экспрессии, которую мы детектируем в опухолевой ткани, т.е. в опухолевых клетках и в строме. Мы полагаем, что конечный результат снижения экспрессии АВС-транспортёров в опухолевой ткани, ее причина сокращение опухолевой паренхимы и элиминация опухолевых клонов под действием химиопрепаратов, но элиминируются только те клоны, у которых нарушены механизмы up-регуляции экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в ответ на химиотерапию. В этом состоит взаимодействие этих процессов – снижения экспрессии генов АВС-транспортёров и элиминации опухолевых клеток в процессе НАХТ. У больных отмечается хороший ответ на НАХТ и благоприятный прогноз.

Наконец последний вариант – это истинное снижение экспрессии генов АВС-транспортёров в опухолевых клетках в процессе НАХТ. По-видимому, этот вариант не связан с частотой CNA, поскольку в процессе химиотерапии не происходит никаких изменений в опухоли. Не изменяется частота CNA, опухолевая паренхима и число мутантных клонов. Отсутствуют делеции локусов АВС-транспортёров. Как было установлено снижение экспрессии обусловлено уникальной хромосомной аномалией – амплификацией региона 3p12.3, в котором среди прочих генов локализован *DAP4*, усиливающий *MST1*-индуцированный апоптоз и стабилизирующий p53, являющегося негативным регулятором экспрессии АВС-транспортёров. Еще одним дополнительным фактором, который может определять истинное снижение экспрессии, но только не как самостоятельный фактор, это делеция локуса 17q13.1, содержащего ген-супрессор опухолевого роста *TP53*. Предполагается, что при делеции локуса, второй не делетированный аллель остается без мутаций, а хорошо известно, что дикий TP53 ингибирует экспрессию АВС-транспортёров. У больных хороший ответ на НАХТ и благоприятный прогноз.

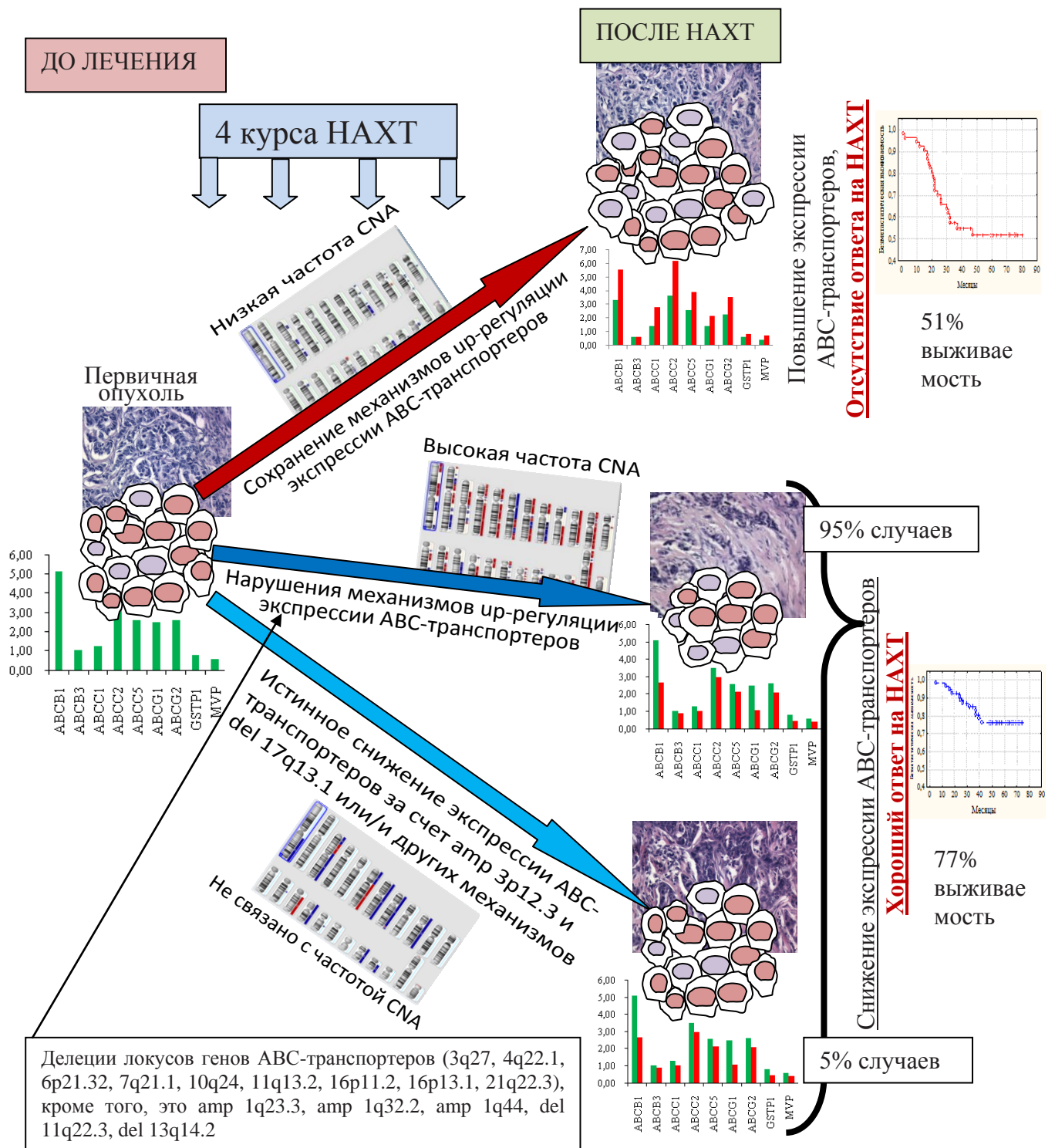


Рисунок 38. – ABC-транспортеры: регуляции и клиническая значимость.

- 1-вариант: В клетках первичной опухоли низкая частота CNA, сохраняются механизмы ир-регуляции экспрессии ABC-транспортеров. В процессе НАХТ повышается уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухолевых клетках, формируется адаптивная МЛУ. Опухолевые клетки не элиминируются, число мутантных клонов увеличивается или не изменяется. Ответ на НАХТ отсутствует, прогноз неблагоприятный.
- 2-вариант: 95% случаев снижения экспрессии генов ABC. В клетках первичной опухоли большое количество CNA, нарушены механизмы ир-регуляции экспрессии ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты за счет несбалансированных хромосомных аномалий (CNA). В процессе НАХТ экспрессия ABC-транспортеров не повышается, в опухолевых клетках не формируется адаптивная МЛУ. Происходит уменьшение опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов. При уменьшении соотношения опухолевой паренхимы и стромы экспрессия генов ABC снижается. Ответ на НАХТ хороший, прогноз благоприятный.
- 3-вариант: 5% случаев снижения экспрессии генов ABC. В опухолевых клетках амплификация 3p12.3 и 17q13.1. В процессе НАХТ опухолевые клетки не элиминируются, число мутантных клонов не изменяется, происходит истинное снижение экспрессии генов ABC в опухолевых клетках.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам считается одной из главных причин неэффективности терапии злокачественных новообразований. Наиболее часто ее связывают с повышением экспрессии энергозависимых АВС-транспортеров (АТФ-Binding Cassette) лекарств, которые осуществляют выброс цитостатических препаратов из опухолевых клеток против градиента концентрации с затратой энергии АТФ. Существуют два типа лекарственной устойчивости: естественная и приобретенная. Естественной лекарственной устойчивостью характеризуются опухоли, происходящие из тканей с высоким уровнем обмена (почки, надпочечники, печень, поджелудочная железа и др.) или барьерностью (головной мозг), в которых отмечается гиперэкспрессия АВС-транспортеров. Эти опухоли обладают крайне низкой чувствительностью к химиотерапии. Для большинства других опухолей, в том числе и РМЖ, было показано, что естественная или предсуществующая лекарственная устойчивость (за счет высокой начальной экспрессии генов АВС-транспортеров), слабо ассоциирована с ответом на химиотерапию и прогнозом в клинических условиях. По-видимому, это связано с тем, что в тканях с высоким уровнем метаболизма АВС-транспортеры экспрессируются практически конститутивно и на очень высоком уровне, в то время как в ткани молочной железы экспрессия АВС-транспортеров индуцибельная, в зависимости от необходимости и наличия стимула. В этой связи для РМЖ наибольший интерес представляют так называемые "адаптационные изменения" или приобретенная МЛУ, определяемая изменением (повышением уровня) экспрессии АВС-транспортеров в опухоли при проведении химиотерапии. Для характеристики приобретенной МЛУ необходимо минимум две точки оценки экспрессии генов АВС-транспортеров – до воздействия и после воздействия. Огромное количество экспериментальных работ в этом направлении и довольно значительное количество клинических исследований было проведено, однако однозначно доказать роль генов АВС в устойчивости опухоли к химиотерапии, так и не удалось, поскольку закономерности полученные на моделях далеко не так однозначно работали в клинических условиях, как многим бы хотелось. Итогом таких несоответствий явился, по сути, провал в разработке ингибиторов АВС-транспортеров для предотвращения формирования в опухоли фенотипа множественной лекарственной устойчивости [Tamaki A., et al., 2011].

В настоящей работе исследовались клиническая значимость и механизмы регуляции приобретенной множественной лекарственной устойчивости опухоли молочной железы в процессе НАХТ. Внимание было сосредоточено на ключевых генах МЛУ (для краткости, АВС-транспортеров, хотя последние два к таковым не относятся): *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*,

ABCC2, *ABCC5*, *ABCG1*, и *ABCG2* и *MVP (LRP1)*. Для исследования была сформирована база данных № 2013621213 от 24 сентября 2013 г. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В. «База данных экспрессионный и клинико-патологических параметров пациентов с диагнозом рак молочной железы». У всех 145 больных экспрессия ABC-транспортёров оценивалась минимум в двух точках: до лечения в биопсийном материале и после НАХТ в операционном материале. У 25 пациентов также дополнительно экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости оценивалась в биопсии на 7 и 21 сутки после начала НАХТ.

Для определения уровня экспрессии ABC-транспортёров в опухолевой ткани был использован метод количественной ПЦР в режиме реального времени [Climent J., et al., 2007]. Благодаря своей гибкости и высокой точности методика количественной ПЦР в реальном времени нашла множество применений, одним из которых является оценка представленности транскриптов различных генов в биологических образцах [Anghel S.I., et al., 2012]. В наших исследованиях была использована технология TaqMan с применением, помимо обычных праймеров, линейно-разрушаемого олигонуклеотидного зонда с флуоресцентной меткой (FAM). Количественная ПЦР в режиме реального времени по технологии TaqMan признана «золотым» стандартом для оценки экспрессионной активности генов ABC-транспортёров [Gillet J.P., et al., 2011], что и определило её использование в настоящей работе. Для выполнения количественной реакции ПЦР в режиме реального времени из каждого клинического образца опухоли выделялась тотальная РНК, при помощи высококачественных наборов фирмы Qiagen Германия. Качество РНК подтверждалось спектрофотометрически и при помощи капиллярного электрофореза с определением параметра RIN. Только при RIN более 5 РНК использовалась для постановки количественной ПЦР.

Известно, что экспрессия генов и экспрессия белков зачастую не соответствуют друг другу. Это связано с посттранскрипционной (микроРНК, альтернативный сплайсинг и пр.) и с посттрансляционной регуляцией экспрессии [Ow T.J., et al., 2013]. Поэтому для полноценности картины был проведен еще и анализ представленности в ткани белков ABC-транспортёров. Для этого был использован метод иммуногистохимии в полуколичественном формате, когда определялся процент клеток, экспрессирующих тот или иной ABC-транспортёр. Основным преимуществом иммуногистохимического анализа является точное определение *in situ* экспрессии любых белков, в том числе и ABC-транспортёров именно в опухолевых клетках или стромальных элементах [Gatza M.L., et

al., 2010], а не в опухолевой ткани в целом (и в паренхиме, и в строме), как при количественной ПЦР в нашем случае.

Одним из важных механизмов регуляции экспрессии генов является метилирование промоторных регионов генов. Для исследования метилирования промоторов была использована методика метилчувствительной ПЦР. Праймеры были подобраны к промоторам генов *ABCB1*, *ABCG2* и *MVP*. Метилирование CpG промотора гена *ABCB1* подтверждалось также бисульфитной конверсией с последующим секвенированием.

Ген *TP53* является известным регулятором ABC-транспортёров, его структурные и/или функциональные изменения (полиморфизмы, мутации, хромосомные перестройки) могут существенно влиять на активность генов ABC. Были исследованы полиморфизм гена при помощи ПЦР в режиме реального времени, соматические мутации гена в опухолевой ткани методом HRM с последующим секвенированием и делеции локуса гена *TP53* в опухолевой ткани при помощи микроматричного анализа.

Основываясь на данных о высоком уровне хромосомных aberrаций в опухоли молочной железы, мы предположили их роль в регуляции экспрессии ABC-транспортёров. При помощи микроматричного анализа были изучены все структурные и числовые аномалии всех хромосом в опухоли молочной железы. Технология ДНК-микроматриц – одно из новейших достижений молекулярной биологии, применяется для картирования генов и выявления различного рода мутаций, SNP и широкого спектра хромосомных аномалий [Yan L., et al., 2007]. В нашем исследовании была использована микроматрица высокой плотности фирмы Affymetrix (USA), CytoScan™ HD Array. Применение данного инструмента позволило исследовать связь изменения экспрессии генов ABC-транспортёров с CNA (делециями и амплификациями хромосомных регионов) в масштабах полногеномного исследования для каждого пациента. Помимо непосредственного определения структурных и числовых хромосомных аномалий микроматрица CytoScan™ HD Array позволяет количественно оценивать представленность мутантной ДНК в образце (мозаичность мутации) на фоне нормальной ДНК (прежде всего ДНК стромы), тем самым можно количественно оценивать представленность различных опухолевых клонов и паренхиматозно-стромальное соотношение в целом. Исследовались образцы до лечения и после НАХТ.

При статистической обработке данных использовались самые жесткие критерии для оценки различий между выборками: двусторонний критерий Фишера, для качественных данных, критерий Вилкоксона-Манна-Уитни (в подавляющем большинстве случаев выборки не подчинялись нормальному распределению), лог-ранговый критерий и др.

Первая часть работы посвящена исследованию клинической значимости адаптивной множественной лекарственной устойчивости. Как обычно, в любых клинических ассоциативных исследованиях, на первом этапе надо было провести анализ связи изучаемого признака с основными клинико-морфологическими параметрами, чтобы выявить, связан ли этот признак с патогенетически значимыми особенностями злокачественного процесса. Была изучена экспрессия в опухолевой ткани ABC-транспортёров или генов множественной лекарственной устойчивости. Исследование ее связи с основными клинико-морфологическими параметрами важно с точки зрения выявления дальнейших направлений исследований и с точки зрения исключения или учета в дальнейшем анализе влияния тех или иных клинических показателей.

Всего лишь несколько генов до лечения показали связь с основными клинико-морфологическими параметрами: уровень экспрессии *ABCB3* ассоциирован с возрастом, *ABCC2* с менструальным статусом, *ABCG2* с размером опухоли, *ABCC5* с лимфогенным метастазированием и *ABCG1* с ER статусом. На наш взгляд, это большей частью случайные ассоциации, обусловленные большим количеством сравниваемых параметров. Это соответствует данным других авторов и объясняет слабую ассоциацию основных клинико-патологических параметров (за исключением размера опухоли) с ответом на НАХТ. Литературные данные показывают, что размер опухоли является достаточно важным клиническим параметром, который связан с прогнозом и с непосредственным ответом на предоперационную химиотерапию. В нашем исследовании экспрессия шести (двух – на уровне тенденции) из девяти ABC-транспортёров в опухоли молочной железы после НАХТ (но не до лечения) была связана с размером первичной опухоли, т.е. экспрессия генов МЛУ в ответ на воздействие химиопрепаратов, или адаптивная экспрессия, ассоциирована с объемом опухоли до лечения.

Следующим этапом работы было изучение связи экспрессии генов ABC-транспортёров с непосредственным эффектом предоперационного лечения. Сравнивали уровень экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ у больных с объективным клиническим ответом на ХТ (Частичная регрессия+Полная регрессия, n = 73) и у пациентов, не ответивших на предоперационную химиотерапию (Стабилизация+Прогрессирование, n = 47). Оказалось, что средний уровень экспрессии практически всех изученных генов (за исключением *ABCB3*) в опухоли до лечения не различался у сравниваемых групп пациентов. Из всех ABC-транспортёров только уровень экспрессии гена *ABCB3* (который больше связан с функционированием иммунной системы и не осуществляет выброс лекарственных препаратов из клеток) в опухоли до лечения был статистически значимо выше у больных с

объективным клиническим ответом. Наши исследования в соответствии с рядом других работ достаточно четко показали, что в клинических условиях для опухоли молочной железы предсуществующая множественная лекарственная устойчивость, определяемая начальным уровнем экспрессии генов и белков ABC-транспортеров, не играет существенной роли в устойчивости к химиотерапии. Однако, после проведения предоперационной химиотерапии происходит дивергенция групп по уровню экспрессии практически всех изученных генов в образцах после НАХТ. У больных с объективным ответом средние значения экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1*, *ABCG2* и *MVP* были статистически значимо ниже после НАХТ по сравнению с уровнем до лечения. У пациентов с устойчивостью к химиотерапии отмечается увеличение уровня экспрессии большинства генов в ткани опухоли после НАХТ по сравнению с уровнем до лечения ($10^{-6} < p < 0,04$, по непараметрическому критерию Вилкоксона для связанных групп). Это показывает связь ответа на НАХТ и изменения экспрессии ABC-транспортеров. Для подтверждения этой связи был проведен анализ ассоциации частоты снижения или повышения экспрессии с эффектом НАХТ. Количественные данные по уровню экспрессии ABC генов в образцах опухоли до лечения и после НАХТ заменили на качественные данные. Если экспрессия в образце до лечения была ниже, чем в операционном материале после НАХТ, то говорили о повышении экспрессии гена у данного больного. В случае, если экспрессия до лечения была выше, чем в операционном материале, речь шла о снижении экспрессии гена у больного, отсутствие экспрессии гена в обоих образцах также приравнивали к снижению экспрессии. При анализе качественных данных подтверждается ассоциация изменения экспрессии ABC-транспортеров и эффективности НАХТ. У пациенток с объективным клиническим ответом в опухоли наблюдается снижение экспрессии генов МЛУ в 61-84% случаев, а у пациенток с отсутствием ответа в процессе проведения химиотерапии наблюдается повышение уровня экспрессии этих генов в опухоли в 63-88 % случаев ($0,02 < p < 1,1 \times 10^{-12}$). Связь эффекта НАХТ с изменением экспрессии ABC-транспортеров подтверждает логистическая регрессия, в которой эффективность НАХТ выступала в качестве зависимой бинарной переменной. Логистический регрессионный анализ продемонстрировал сильную связь между изменением экспрессии каждого из генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1*, *ABCG2*, *MVP* с ответом на НАХТ (OR=4,98 – 38,1 (*ABCC1* и *ABCB1*); $0,00008 < p < 10^{-14}$).

Таким образом, нами была впервые установлена и подтверждена несколькими видами статистического анализа связь изменения экспрессии генов ABC-транспортеров в опухолевой ткани молочной железы в процессе лечения с эффектом НАХТ. Фактически установлены феномены индивидуального повышения или снижения экспрессии ABC-

транспортеров в опухоли молочной железы при проведении химиотерапии и связи с этими изменениями ответа на предоперационную химиотерапию. Наши исследования четко показали, что в реализации эффекта НАХТ играет роль не предсуществующая, а адаптивная (изменяемая в процессе лечения) множественная лекарственная устойчивость. Это обосновывает новую стратегию управления множественной лекарственной устойчивостью через регулирование экспрессии АВС-транспортеров (а не через подавление активности белков АВС, как это предлагалось ранее [Tamaki A., et al., 2011]). Анализ мировой литературы показал, что существуют клинические данные о повышении экспрессии генов и белков АВС-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ, однако найдено лишь одно клиническое исследование, которое подтвердило наши приоритетные данные о снижении экспрессии генов АВС в опухоли в процессе предоперационной химиотерапии [Kim B., et al., 2013, Linn S.C., et al., 1997].

Казавшийся очевидным тезис о том, что высокий уровень экспрессии АВС-транспортеров и их продуктов в опухолевых клетках обеспечивает устойчивость к химиопрепаратам и является неблагоприятным прогностическим фактором, не получил убедительных доказательств в мировых клинических исследованиях, т.е. данные о связи предсуществующей МЛУ с прогнозом при РМЖ оказались крайне противоречивыми. Из числа всех исследованных нами генов только для гена *ABCB3* предсуществующий уровень экспрессии в опухоли до лечения был связан с безметастатической выживаемостью. У больных с высоким уровнем экспрессии *ABCB3* пятилетняя безметастатическая выживаемость была выше, чем у больных с низкой экспрессией, а частота больных с метастазами была ниже. Это сочетается со значением высокого уровня экспрессии *ABCB3* для эффекта НАХТ. Предсуществующий уровень экспрессии других изученных АВС-транспортеров не показал связи с безметастатической выживаемостью.

Поскольку была показана роль адаптивной МЛУ в реализации непосредственного эффекта НАХТ, было выдвинуто предположение о том, что изменения экспрессии АВС-транспортеров в процессе химиотерапии могут быть связаны с прогнозом заболевания. Оценивалась безметастатическая выживаемость в зависимости от повышения или снижения экспрессии генов АВС в процессе НАХТ. Оказалось, что изменение экспрессии генов АВС-транспортеров при воздействии химиопрепаратов, в отличие от предсуществующего уровня экспрессии, имеет прогностическую значимость. Повышение опухолевой экспрессии *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в процессе НАХТ является неблагоприятным прогностическим признаком. Безметастатическая выживаемость пациентов с повышением экспрессии колебалась в пределах 50-55%, безметастатическая выживаемость больных со снижением экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1*

колебалась в пределах 73-78% (log-rank test $p = 0,032-0,0061$), и снижение экспрессии является благоприятным прогностическим признаком.

Был проведен анализ клинико-морфологических факторов, оказывающих влияние на безметастатическую выживаемость обследованных пациентов. В целом, прогностическая значимость основных клинико-патологических параметров соответствовала литературным данным [Clark G.M., 1995, Perel'muter V.M., et al., 2008, Wolmark N., et al., 2001, Семиглазов В.Ф. и др., 2009] и зависела от лимфогенного метастазирования, размера опухоли, ее гистологической формы, молекулярного подтипа, степени лекарственного патоморфоза после НАХТ.

Группы со снижением и повышением экспрессии указанных выше трех генов МЛЮ (*ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1*) не различаются между собой по возрасту пациенток, их менструальному статусу, а также размеру опухоли, частоте лимфогенного метастазирования, рецепторному статусу опухоли (ER, PR и HER2), по частотам молекулярных подтипов, гистологической форме и схеме НАХТ. Это дает основания считать, что именно разная направленность изменения экспрессии генов после НАХТ влияет на выживаемость. Изменение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в процессе НАХТ может рассматриваться как новый потенциальный прогностический фактор, который не зависит от стандартных клинико-патологических факторов прогноза. С практической точки зрения, оценка эффекта предоперационной химиотерапии в сочетании с определением направления изменения опухолевой экспрессии генов ABC-транспортеров может существенно повысить эффективность прогнозирования исхода РМЖ.

Уменьшение экспрессии пяти основных генов АТФ-Binding Cassette – *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* в опухоли молочной железы после проведения НАХТ по сравнению с биопсийными образцами до лечения сочетается с объективным ответом на НАХТ. Повышение экспрессии этих генов было связано с отсутствием непосредственного эффекта НАХТ. У большинства пациентов – 80/106 (75%) наблюдается однонаправленное изменение экспрессии пяти основных ABC-транспортеров в процессе НАХТ в строгом соответствии с ее эффектом, т.е. снижение при хорошем ответе на НАХТ и повышение при его отсутствии. Это явление было названо нами градиентным феноменом. У 25% не наблюдалось разнонаправленное изменение экспрессии пяти ABC-транспортеров, т.е. градиентный феномен отсутствовал.

При наличии градиентного феномена пятилетняя безметастатическая выживаемость обследованных больных составила 73% против 39% у больных без градиентного феномена (log-rank test $p=0,0018$). Это позволяет рассматривать наличие градиентного

феномена у пациентов в качестве благоприятного прогностического фактора. При отсутствии градиентного феномена относительный риск развития гематогенных метастазов составляет $RR = 1,77(95\%CI 1,11-2,83)$, уровень доверительной вероятности с поправкой Йетса $p = 0,005$. Анализ позволил установить, что градиентный феномен не зависит от размера опухоли, лимфогенного метастазирования и молекулярного подтипа прогностическим фактором и имеет высоко значимую связь с развитием метастатической болезни при раке молочной железы. Механизмы, которые определяют наличие/отсутствие градиентного феномена, его значение для клеточной регуляции, требуют дальнейшего исследования.

Для понимания механизмов формирования адаптивной множественной лекарственной устойчивости необходимо было понять, почему и каким образом при использовании одной и той же схемы лечения у одних больных происходит снижение экспрессии генов ABC в опухоли, и это сочетается с хорошим эффектом, а у других происходит повышение экспрессии генов ABC, и это обуславливает плохой ответ? Дальнейшие наши исследования были посвящены ответу на этот вопрос.

Итак, в наших исследованиях был впервые установлен феномен связи изменения экспрессии (повышения или снижения) генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ с ее эффективностью и прогнозом заболевания. Исходя из физиологической функции ABC-транспортеров, повышение их экспрессии является нормальной реакцией клеток (в том числе и опухолевых) в ответ на химиопрепараты. Поэтому повышение экспрессии этих генов в процессе химиотерапии известно в литературе, и во многом понятны механизмы активации системы ABC-транспортеров. В ответ на химиопрепараты и многие стрессорные для клетки внешние воздействия происходит индукция экспрессии ABC-транспортеров [Chen K.G., et al., 2012].

Снижение экспрессии намного более непонятный и сложный феномен. Во-первых только в одном клиническом исследовании мы находим подтверждение феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в ответ на воздействие химиопрепаратов [Kim V., et al., 2013]. Во-вторых, в опытах *in vitro* на опухолевых линиях не было показано снижения экспрессии генов ABC при воздействии химиопрепаратов. Это позволяет сделать важные логические предположения: снижение экспрессии в ответ на химиопрепараты может являться следствием несовершенства методических подходов к измерению и интерпретации, снижение экспрессии может быть связано с тем, что операция выполнялась через 4-5 недель после последнего курса НАХТ и экспрессия ABC-транспортеров в опухоли после НАХТ могла вернуться нормальному уровню естественным образом, наконец, снижение экспрессии может проявляться только в

клинических условиях, а значит обусловлено индивидуальными факторами опухоли, микроокружения и/или является атрибутом aberrантной клинической опухоли.

К таким факторам могут относиться: эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов ABC, в частности, метилирование промоторных регионов. Известен факт, что продукт гена-супрессора опухолевого роста p53 дикого типа негативно регулирует транскрипцию ABC-транспортеров [Johnson R.A., et al., 2001, Thottassery J.V., et al., 1997], в то время как мутантный, функционально измененный p53 положительно регулирует экспрессию генов ABC [Sampath J., et al., 2001]. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность в опухоли молочной железы [Завьялова М.В., и др., 2008] может вносить вклад в регуляцию ABC-транспортеров, учитывая ее связь с ответом на НАХТ [Zavyalova M.V., et al., 2011, Завьялова М.В., и др., 2008]. Несбалансированные хромосомные аномалии (делеции и амплификации), в избытке выявляющиеся в солидных опухолях, могут отражаться на регуляции экспрессии ABC-транспортеров в системе *in vivo*, и наконец, клональная эволюция опухоли, определяемая изменением опухолевых клонов в процессе НАХТ и снижением количества опухолевых клеток, экспрессирующих гены ABC вследствие элиминации клеток во время химиотерапии может оказывать влияние на экспрессию генов ABC. К этому стоит добавить, что клиничко-морфологические параметры не оказывали существенного влияния на изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении НАХТ, и не являются теми индивидуальными факторами опухоли, которые определяют негативную регуляцию экспрессии ABC-транспортеров.

Все вышесказанное, по сути, обозначает проблему поиска путей регуляции экспрессии ABC-транспортеров, которые объясняют феномен снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ. Прежде всего, для доказательства существования феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ у 25 пациентов была проанализирована экспрессия ABC-транспортеров в четырех точках: до лечения, на 7-е и на 21-е сутки после начала 1 курса НАХТ и в операционном материале через 3-5 недель после всех курсов НАХТ. Уже на 7-е сутки у некоторых пациентов наблюдается снижение экспрессии генов ABC. За такой короткий период не может произойти и повышение и естественное убывание экспрессии генов ABC, следовательно, можно констатировать, что феномен снижения экспрессии ABC-транспортеров при воздействии химиопрепаратов реально существует.

Была установлена продолжительность периода адаптивного повышения экспрессии ABC-транспортеров в ответ на лечение и показано, насколько долго сохраняется повышенная экспрессия генов МЛУ в опухоли после прекращения химиотерапии. Для

этого проанализировано время окончания химиотерапии и дата оперативного вмешательства по историям болезни. В редких случаях период между последним курсом химиотерапии и оперативным вмешательством существенно превышал 5 недель. Были случаи, когда повышенная, относительно исходного уровня, экспрессия генов МЛЮ сохранялась более 80-90 дней (срок от окончания последнего курса до операции). В тоже время, снижение экспрессии относительно исходного уровня может уже наблюдаться через 10 дней после окончания курсов НАХТ. Эти результаты свидетельствует о том, что продолжительность адаптивного повышения экспрессии ABC-транспортёров в ответ на лечение зависит от индивидуальных особенностей пациентов и их опухолей. Кроме того, мы оценили корреляционную связь длительности промежутка между последним курсом НАХТ и операцией с уровнем экспрессии генов ABC в операционном материале, при наличие такой связи можно было бы говорить о естественном убывании экспрессии ABC-транспортёров после окончания химиотерапевтического воздействия. Однако длительность промежутка между последним курсом НАХТ и операцией и уровень экспрессии генов ABC в операционном материале не коррелировали и это опровергает наше предположение о естественной нормализации уровня экспрессии ABC-транспортёров. Таким образом, можно сделать вывод о том, что феномен снижения экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы при воздействии химиопрепаратов действительно существует, адаптивное повышение экспрессии может быть длительным и в период до трех месяцев не происходит естественной нормализации уровня экспрессии ABC-транспортёров в опухолевых клетках, т.е. если адаптивная МЛЮ сформировалась, то она длительно сохраняется и это надо учитывать при формировании тактики лечения.

Дополнительно феномен снижения экспрессии ABC-транспортёров был подтвержден и на уровне белковых продуктов генов ABC-транспортёров. В операционном материале после проведения НАХТ у 38 больных была изучена экспрессия семи белков МЛЮ: Mvp – продукта гена *MVP*, Vscr1 – продукта гена *ABCG1*, Vscr – продукта гена *ABCG2*, Mrp1 – продукта гена *ABCC1*, Mrp2 – белка гена *ABCC2* и Р-гликопротеина – продукта гена *ABCB1*. Экспрессия белков ABC-транспортёров слабо коррелировала с уровнем экспрессии своих генов ABC, что довольно часто встречается [Ow T.J., et al., 2013]. Однако, у больных, в опухоли которых при проведении НАХТ наблюдалось снижение экспрессии мРНК генов *MVP*, *ABCG2*, *ABCC1* и *ABCB1*, в образцах после НАХТ отмечается низкий процент клеток, экспрессирующих соответствующие белки: Mvp, Vscr, Mrp1 и Р-гликопротеин, по сравнению с пациентами, у которых экспрессия мРНК генов ABC-транспортёров в процессе НАХТ повышается. Это еще раз подтверждает

существование феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты, теперь уже на белковом уровне.

По сути, мы, достаточно убедительно, справились с задачей доказательства существования феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ и теперь переходим непосредственно к изучению механизмов этого феномена.

Хорошо известно, что инвазивно-протоковая карцинома молочной железы (80% от всех опухолей молочной железы) показывает высокую степень внутриопухолевой морфологической гетерогенности, которая связана с различным клиническим прогнозом. Инфильтративный компонент инвазивного протокового рака представлен тубулярными, трабекулярными, солидными, альвеолярными структурами и дискретными группами опухолевых клеток [Zavyalova M.V., et al., 2011]. Ранее были получены данные о прогностическом значении альвеолярных структур для лимфогенного метастазирования, а соотношения трабекулярных и тубулярных структур – для гематогенного [Perel'muter V.M, et al., 2008, Winchester D., et al., 2000, Zavjalova M.V., et al., 2006, Zavyalova M.V., et al., 2011, Перельмутер В.М., и др., 2007]. Пациенты с альвеолярными структурами в опухоли были менее чувствительны к НАХТ, чем больные, у которых в опухоли не было альвеолярных структур. Количество больных, у которых отсутствовал ответ опухоли на НАХТ в группе с альвеолярными структурами, составило 61,9 %, а в группе больных без альвеолярных структур – 46,4% ($p = 0,0028$). Также и больные с трабекулярными структурами в опухоли чаще показывали устойчивость к химиотерапии, по сравнению с пациентами без этих структур (58,8% против 45,3%; $p = 0,0272$). Полученные результаты продемонстрировали, что внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы, оказывает существенное влияние на эффективность неoadъювантной химиотерапии. В данном исследовании на более значительном материале, чем это было ранее, мы с большей достоверной вероятностью, подтвердили ассоциацию между наличием альвеолярных структур и трабекулярных структур в инфильтративном компоненте карциномы молочной железы и отсутствием ответа на НАХТ.

Мы сравнили уровень экспрессии генов ABC в опухолевой ткани молочной железы до лечения и после НАХТ при наличии или отсутствии в ней разных типов морфологических структур. Морфологические структуры не оказывали существенного влияния на экспрессию и изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Опухоли с наличием или отсутствием тех или иных морфологических структур не показали отличия по уровню экспрессии ABC-транспортеров и частоте повышения или снижения экспрессии генов ABC. Непосредственные измерения в альвеолярных и трабекулярных структурах, вырезанных из опухоли при помощи лазерной

микродиссекции, показали низкий уровень экспрессии генов ABC. Таким образом, внутриопухолевая морфологическая гетерогенность не оказывает влияния на изменение и регуляцию экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Интересные результаты были получены только по гену *ABCB3*, уровень экспрессии которого был статистически значимо ниже в опухоли с альвеолярными структурами (до лечения и после НАХТ) и в опухоли с трабекулярными структурами (до лечения). Согласно ранее представленным данным, у больных с отсутствием ответа на НАХТ отмечается низкий уровень экспрессии гена *ABCB3* в опухоли до лечения, а у больных с объективным ответом отмечается высокий уровень экспрессии *ABCB3*. Эти данные согласуются с результатами оценки связи экспрессии *ABCB3* с морфологическими структурами в опухоли: низкий уровень *ABCB3* связан с плохим ответом на НАХТ с альвеолярными и трабекулярными структурами, наличие которых определяет негативный ответ предоперационную терапию. Следовательно, одним из механизмов, обуславливающих химиорезистентность альвеолярных и трабекулярных структур, является низкая экспрессия гена *ABCB3*.

Следующим изученным нами механизмом, который предположительно мог бы определять экспрессию генов ABC-транспортеров, является метилирование промоторов изучаемых генов. Метилирование промоторных регионов генов является одним из основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов [Jones P.A., 2012]. В опухоли молочной железы уже на ранних стадиях онкогенеза наблюдается общее гипометилирование генома, которое способствует малигнизации [Ehrlich M., 2002]. Наблюдается также и гиперметилирование генов (снижающее их активность), вовлеченных в арест клеточного цикла, апоптоз, и генов супрессоров-опухолевого роста [Laird P.W., 2005, Widschwendter M., et al., 2002]. Что касается ABC-транспортеров, то опухоли оказывается «выгодно» их гипометилирование и высокая активность экспрессии, поскольку помогает избегать повреждающего действия химиотерапии. В этой связи, очень часто наблюдается низкий уровень метилирования промоторных регионов этих генов в опухолевой ткани [Sharma G., et al., 2010].

Была исследована связь метилирования промоторной области трех генов *MVP*, *ABCG2* и *ABCB1* непосредственно в опухолевой ткани молочной железы до лечения и уровня экспрессии этих генов до лечения и после НАХТ у конкретных больных. Используя базу данных TRED – Transcriptional Regulatory Element Database (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/TRED/tred.cgi?process=searchPromForm>), были найдены нуклеотидные последовательности промоторов этих трех генов. Метилирование исследовалось при помощи метода метилчувствительной ПЦР. В результате установлено, что гипометилирование промоторных регионов изученных генов сочетается с их высокой

экспрессией до лечения и повышением экспрессии в процессе НАХТ. При гиперметилировании промоторов генов *MVP*, *ABCG2* и *ABCB1*, сочетающимся с низкой экспрессией до лечения, в некоторых случаях отмечается повышение их экспрессии в процессе НАХТ, т.е. гиперметилирование промотора не определяет негативную регуляцию экспрессии гена в процессе НАХТ. Для подтверждения данных метилчувствительной ПЦР было проведено дополнительное исследование метилирования промотора *ABCB1* в опухоли молочной железы до лечения при помощи бисульфитной конверсии и последующего секвенирования, а также определен уровень экспрессии *ABCB1* индивидуально у больных до лечения и после химиотерапии. Подтвердилось, что частота метилирования, в частности количество метилированных CG пар в промоторной области гена *ABCB1*, находится в тесной связи с уровнем экспрессии данного гена в опухоли до лечения. Наличие от 1 до 2 метилированных цитозинов в составе CG пар сочетается с высокой экспрессией *ABCB1* до лечения и повышением экспрессии в процессе НАХТ. Напротив, одновременное присутствие более 2 метилированных CG пар приводило низкому уровню экспрессии гена *ABCB1* до лечения, но при воздействии на опухоль химиопрепаратов наблюдалось повышение экспрессии *ABCB1*. Таким образом, метилирование промоторов генов ABC-транспортеров определяет предсуществующий уровень их экспрессии, но не оказывает влияние на адаптивное изменение экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Одним из объяснений этому является известный феномен снижения метилирования генов ABC в процессе химиотерапии [Wilting R.H., et al., 2012]. Однако пока не установлены точные маркеры, которые позволили бы прогнозировать снижение метилирования промоторов ABC-транспортеров у конкретного больного в процессе проведения химиотерапии в случае их гиперметилирования.

На следующем этапе была изучена роль гена *TP53* в регуляции экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Хорошо известно, что белок p53 дикого типа непосредственно связывается с регионом проксимального промотора гена *ABCB1* и ингибирует транскрипцию *ABCB1* [Johnson R.A., et al., 2001, Scotto K.W., 2003, Thottassery J.V., et al., 1997]. Высокий уровень экспрессии p53 может быть индуцирован химиопрепаратами из-за повреждения ДНК в опухолевых клетках. Однако, более чем у 50% опухолей ген *TP53* мутирован, т.е. не выполняет своей физиологической функции гена опухолевой супрессии, частота мутаций *TP53* при РМЖ составляет до 25% [Soussi, et al., 2007, Soussi, et al., 2005, Olivier, et al., 2010]. Чаще мутации *TP53* встречаются на поздней стадии РМЖ или в более агрессивных подтипах, таких, как тройной негативный или HER2-позитивный рак молочной железы [Langerod A., et al., 2007]. В системе *in vitro* было четко показано, что мутантный p53 стимулирует экспрессию *ABCB1* и выступает в

качестве онкогена [Sampath J., et al., 2001]. Некоторые типы мутаций p53 в состоянии активировать промотор *ABCBI* [Chin K.V., et al., 1992, Dittmer D., et al., 1993] или подавлять его способность ингибировать транскрипцию *ABCBI*.

Показано, что наличие соматических мутаций гена *TP53* в опухоли сопряжено с отсутствием ответа на НАХТ, что может быть связано со стимуляцией экспрессии гена *ABCBI*, как это было установлено в работе [Sampath J., et al., 2001]) и других ABC-транспортёров. На следующем этапе была определена связь 1 экзонного (rs1042522) и двух интронных (rs12602273 и rs8073498) полиморфизмов гена *TP53* с эффективностью НАХТ и экспрессией ABC-транспортёров. Rs12602273 и rs8073498 не показали значимой роли в регуляции экспрессии ABC-транспортёров и эффективности НАХТ. Напротив, экзонный полиморфизм *TP53+119C>G Arg72Pro* rs1042522 показал хорошую связь с эффектом НАХТ и экспрессией генов ABC. Носители дикого *Arg/Arg* генотипа rs1042522 хорошо отвечали на НАХТ, по сравнению с носителями гетерозиготного генотипа. Высокая эффективность НАХТ у носителей *Arg/Arg* генотипа сочеталась с низкой экспрессией генов *ABCC1* и *ABCC5* в образцах после НАХТ и со снижением экспрессии генов *ABCBI*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP* в процессе НАХТ, в сравнении с гетерозиготным и минорным генотипами. У носителей *Arg/Arg* генотипа rs1042522 статистически значимо чаще наблюдается гаплотипическая недостаточность (делеция) локуса 17p13.1, в котором расположен ген *TP53* (в 27/41 - 65% случаев, чем у носителей *Arg/Pro+Pro/Pro* генотипов (12/29 в 41% случаев). Делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* не влияет на уровень экспрессии ABC-транспортёров в опухоли до лечения и после НАХТ. В то же время, при делеции локуса 17p13.1 намного чаще отмечается снижение экспрессии генов ABC в процессе НАХТ, чем при нормальном состоянии локуса 17p13.1. Наконец, у больных с делецией 17p13.1 пятилетняя безметастатическая выживаемость значительно выше (85%), чем у больных с нормальным состоянием региона 17p13.1 (55%) (log-rank test p = 0,024).

Возможным объяснением связи делеции локуса 17p13.1 гена *TP53* и негативной регуляции экспрессии ABC-транспортёров в процессе НАХТ, может быть сохранение второго не делетированного аллеля в диком виде, в то время как при нормальном состоянии локуса 17p13.1, *TP53* должен быть инактивирован при помощи точковых мутации. Большое повышение экспрессии p53 с точковыми мутациями под действием химиопрепаратов (при мутации p53 часто отмечается его повышенная экспрессия в связи с увеличением времени его утилизации и в связи с этим накопления в клетках мутантного белка [Langerod A., et al., 2007]) стимулирует экспрессию ABC-транспортёров в процессе НАХТ. Напротив, даже слабое повышение экспрессии p53 дикого типа за счет

оставшегося не делетированного аллеля под действием химиопрепаратов, приводит к ингибированию экспрессии ABC-транспортеров.

Таким образом, экзонный полиморфизм *TP53* Arg72Pro rs1042522 и делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* оказывают влияние на негативную регуляцию экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Гаплотипическая недостаточность локуса 17p13.1 гена *TP53* является благоприятным прогностическим признаком за счет влияние на экспрессию генов ABC, и может объясняться отсутствием точковых мутаций в последовательности *TP53* при делеционной инактивации одного из его аллелей.

На следующем этапе, мы вплотную приступили к доказательству идеи о том, что причиной снижения экспрессии ABC-транспортеров под действием химиопрепаратов являются многочисленные aberrации (и прежде всего хромосомные), которые характерны для солидных клинических опухолей, определяют внутриопухолевую гетерогенность, и, возможно, нарушают механизмы активации ABC-транспортеров. Была изучена роль структурных и числовых хромосомных аномалий в регуляции экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в процессе НАХТ. Делеции или амплификации хромосомных регионов и отдельных хромосом называют aberrациями числа копий ДНК (CNA – copy number aberration). Эти типы цитогенетических нарушений могут влиять на экспрессию генов, локализованных в регионе CNA, как правило, при делециях экспрессия генов снижена, а при амплификациях - повышена [Huang N., et al., 2012, Xu Y., et al., 2012]. Для исследования использовалась одна из революционных разработок в области цитогенетики – микроматрица высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, позволяющая определять CNA, протяженностью 50 kbp и более и с чувствительностью 5% видеть одновременно весь спектр мутантных опухолевых клонов. С помощью микроматриц было исследована ДНК биопсии опухоли до лечения 68 пациентов.

В опухоли молочной железы наблюдаются структурные CNA практически во всех хромосомных регионах. В первой и восьмой встречаются амплификации в опухолевой ДНК более чем у 30% больных. Делеции с частотой более 50% наблюдались в хромосомных регионах: 8p21.2, 16q21 – 24.1 и 17p13.3 – 17p11.2. Также наблюдается большое количество числовых CNA (более чем в половине образцов), в основном это моносомии по отдельным хромосомам, реже встречаются трисомии. Количество цитобэндов с CNA в опухоли разных пациентов колеблется в очень широких пределах: от 1 до 608, что составляет от 0,1% до 75% от общего числа цитобэндов. Частота цитобэндов с CNA связана с изменением экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы в процессе НАХТ. При снижении экспрессии генов *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и *MVP* в

процессе НАХТ в опухоли наблюдается статистически значимо более высокий (почти в два раза) уровень делеций и CNA в целом, по сравнению с больными, у которых экспрессия этих генов в процессе НАХТ повышается. Это подтверждает предположение о том, что снижение экспрессии генов ABC в процессе НАХТ – феномен, свойственный клинической аберрантной опухоли, у больных со снижением экспрессии ABC-транспортеров действительно больше в опухоли хромосомных аномалий.

Следующим шагом было определение, каких именно хромосомных нарушений больше у больных со снижением. Если исходить из идеи о нарушении механизмов активации ABC-транспортеров, то наше внимание привлекли, прежде всего, делеции локусов самих генов ABC. Был проанализирована экспрессия генов ABC-транспортеров при нормальном состоянии и делеции своих локусов, а частота объективного ответа на НАХТ при делециях локусов генов ABC.

Установлено, что в подавляющем большинстве случаев (75%-100%) при делеции локуса гена ABC в процессе химиотерапии его экспрессии снижается (уровень экспрессии гена в пост-НАХТ образцах опухоли ниже по сравнению с парными пре-НАХТ образцами). Делеция локуса гена ABC не оказывает влияния на предсуществующий уровень его экспрессии. До лечения уровень экспрессии всех изученных генов в опухоли у больных с делецией локуса и без делеции локуса не различался. Однако, делеция локуса гена ABC влияет на формирование адаптивной экспрессии гена – после НАХТ уровень экспрессии делетированного гена был ниже, чем у больных с нормальным состоянием локуса этого гена. Статистически значимые различия достигнуты для генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2*. Уровень экспрессии в пост-НАХТ образцах при делеции локуса в 2,5-7,5 раз ниже, чем в образцах после НАХТ без делеции.

В зависимости от гена, у 9-49% пациентов со снижением экспрессии гена ABC наблюдалась делеция его локуса, т.е. делецией локуса можно объяснить до половины случаев снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ. Наибольшая частота делеций локуса была выявлена для гена *ABCC2* (49% случаев снижения экспрессии), у других значимых для формирования МЛУ генов частоты делеций локусов колебались в пределах 20-25%.

При делеции локусов ABC-транспортеров отмечается хороший ответ опухоли на НАХТ. Все 100% пациентов с делециями локусов 7q21.1, 6p21.32 и 3q27 генов *ABCB1*, *ABCB3* и *ABCC5* соответственно, ответили на НАХТ. Объективный клинический ответ НАХТ у больных РМЖ с делециями локусов генов *ABCC1* (16p13.1), *ABCC2* (10q24), *ABCG1* (21q22.3) и *ABCG2* (4q22.1) составил 62% – 88%. Это позволяет предполагать возможность использования делеций локусов генов МЛУ в качестве маркеров прогноза

ожидаемой эффективности НАХТ. Кроме того, при делеции хотя бы в одном из локусов генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP* отмечаются высокие показатели безметастатической выживаемости – метастазы были отмечены только у 1 больной из 22 в группе с делецией хотя бы одного из генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP*, в то время как в группе без делеции локусов этих генов метастазы наблюдались у 15/46 больных (log-rank test $p = 0,008$), т.е. делеции локусов этих генов являются благоприятным прогностическим фактором.

Для того чтобы определить хромосомные регионы с CNA, которые могут участвовать в регуляции делетированных генов ABC-транспортеров, мы провели анализ связи наличия делеции локусов генов ABC и CNA всех цитобэндов. Для этого всех обследованных больных разделили на две группы: первую группу составили больные, у которых хотя бы в одном из локусов всех изученных генов ABC-транспортеров наблюдается делеция ($n = 34$); во вторую группу вошли больные, у которых не было делеции локусов изученных генов ABC-транспортеров ($n = 34$). Оказалось, что у 85% (29/34) больных с делецией хотя бы одного локуса гена ABC-транспортера наблюдалась делеция в длинном плече 13 хромосомы в регионе 13q14.2. У больных без делеций локусов генов МЛУ только в 9% (3/34) случаев отмечалась делеция 13q14.2. По критерию Фишера различия между двумя группами по частоте встречаемости делеции 13q14.2 были статистически значимыми ($p = 2.03 \times 10^{-11}$). Среди кодирующих белки генов, локализованных в 13q14.2, наиболее известным является ген-супрессор опухолевого роста *RBI*. С одной стороны, делеция *RBI* может быть одной просто из причин нарушения механизмов системы активации ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты, с другой стороны, теоретически возможен и механизм непосредственной негативной регуляции экспрессии ABC-транспортеров через деацетилазу гистонов *HDAC1* и *RBI*.

Далее были идентифицированы хромосомные локусы, связанные с регуляцией экспрессии каждого ABC-транспортера в отдельности. Установлено, что амплификация локуса 1q32.2 длинного плеча 1 хромосомы ассоциирована со снижением экспрессии гена *ABCB1* в процессе НАХТ. У 72% больных с амплификацией локуса 1q32.2 наблюдается снижение экспрессии гена *ABCB1*, тогда как у 66% больных с нормальным состоянием 1q32.2 хромосомного региона экспрессия гена *ABCB1* повышается ($p = 0,003$ по критерию Фишера). У 64% (25/39) больных с делецией 11q22.3 снижается экспрессия *ABCB1* при проведении НАХТ, а у 83% (24/29) больных с нормальным состоянием региона отмечено повышение экспрессии *ABCB1* в процессе химиотерапии ($p = 0,0002$).

Амплификация локуса 1q32.2 длинного плеча 1 хромосомы и делеция локуса 11q22.3 ассоциированы со снижением экспрессии не только гена *ABCB1*, но также и генов *ABCC2*

и *ABCG2* в процессе НАХТ, а нормальное состояние локуса – с повышением экспрессии этих генов. Гены *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG2* образуют единый кластер с общими механизмами регуляции экспрессии при помощи единого регуляторного паттерна. Это подтверждается взаимной корреляцией уровня экспрессии этих трех генов до лечения и после НАХТ. Общие механизмы регуляции экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG2* могут быть реализованы с участием генов, локализованных в регионах 1q32.2 и 11q22.3, которые и образуют регуляторный паттерн. Нарушение за счет амплификации и делеции этих механизмов приводит, в конечном счете, к снижению уровня экспрессии генов в образцах опухоли, полученных после химиотерапии. По-видимому, вторым регуляторным регионом следует признать локус 1q23.3, амплификации этого локуса с наибольшей частотой встречается при снижении экспрессии генов *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC5* и *MVP*.

Интересным результатом проведенного анализа явилась идентификация общего, для всех изученных генов МЛУ, локуса 17q13.1, делеции которого с наибольшей частотой (в 63-74% случаев) встречались при снижении экспрессии этих генов в процессе НАХТ. Его делеция сопряжена со снижением экспрессии всех АВС-транспортёров в процессе НАХТ. В области 17q13.1 локализован хорошо известный ген-супрессор опухолевого роста – *TP53*. Получается, что *TP53* участвует в регуляции всех исследованных нами АВС-транспортёров, причем, его гаплотипическая недостаточность ассоциирована с негативной регуляцией генов МЛУ.

Очень интересным и важным моментом является то, что со снижением экспрессии генов АВС-транспортёров в процессе НАХТ сопряжены СНА, а не нормальное состояние локусов. Это еще раз подтверждает мысль о том, что снижение экспрессии АВС-транспортёров все-таки является aberrantным явлением, характерным именно для клинической опухоли, и не наблюдается в случае исследований на культурах опухолевых клеток. Нарушения регуляторных паттернов, такие, как амплификации локусов 1q23.3, 1q32.2, делеции 13q14.2, 11q22.3, 17q13.1 приводят к снижению экспрессии, а не к повышению под действием химиопрепаратов, как это происходит при сохранении нормальных механизмов регуляции.

Хромосомные аномалии все же показывают только ассоциацию со снижением экспрессии АВС-транспортёров в процессе НАХТ, но не объясняют механизма снижения. Мы изучили, что непосредственно происходит с опухолевыми клонами в процессе НАХТ, как клональная эволюция опухоли под действием химиопрепаратов, участвует в реализации феномена снижения экспрессии АВС-транспортёров.

Считается, что возникновение и эволюция опухолевых клонов, различающихся набором генетических нарушений, является основным механизмом формирования

внутриопухолевой гетерогенности [Nassar A., et al., 2010], [Fisher R., et al., 2013, Michor F., et al., 2010]. При воздействии на опухоль химиопрепаратов, происходят эволюционные изменения мутантных опухолевых клонов. Опухолевые клоны могут частично или полностью элиминироваться, образовываться новые клоны или минорные клоны могут занимать доминантное положение, заселяя освободившиеся место после гибели отдельных клонов. Различные опухолевые клоны РМЖ характеризуются специфическими структурными и числовыми хромосомными aberrациями, которые образовались в результате клональной экспансии [Navin N., et al., 2011, Ng C.K., et al., 2012]. Все их одновременно можно видеть при помощи микроматрицы CytoScan HD Array. Кроме этого можно производить и количественный анализ статуса числа копий (CNstate) каждой мозаичной хромосомной aberrации, которая фактически говорит о представленности (в %) мутантного клона с данной аномалией на фоне нормальной ДНК опухолевой стромы и других мутантных клонов, без данной аномалии. Фактически, CNstate отражает соотношение опухолевой паренхимы и стромы в опухолевой ткани молочной железы.

Для этого исследования из числа пациентов случайным образом были отобраны 26 больных, у которых микроматричный анализ был проведен не только в биопсии до лечения, но и в операционном материале после проведения НАХТ этих же пациентов. Установлено, что в большинстве случаев изменение частоты CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов в процессе НАХТ хорошо коррелирует с изменением объема опухолевого узла в ответ на химиотерапию (коэффициент корреляции Спирмена $r = 0,54-0,72$, $p < 0,05$). По нашему мнению, эти показатели могут служить в качестве дополнительных критериев для оценки эффективности НАХТ, и по ним можно говорить о генетической эффективности НАХТ. В отличие от объема опухоли, изменение частоты CNA, опухолевой паренхимы CNstate и изменения числа мутантных клонов отражают истинное влияние химиотерапии на опухоль и показывают, как в процессе химиотерапии меняется генетический ландшафт опухоли. При увеличении числа мутантных клонов у 5 из 6 (83%) пациенток наблюдались метастазы. При уменьшении числа мутантных клонов или отсутствие генетического ответа опухоли на НАХТ, наблюдается 100% выживаемость (Log-Rank Test $p = 0,00001$). Мы предполагаем, что размножившиеся или образовавшиеся *de novo* мутантные опухолевые клоны и являются теми клонами, которые выходят в кровеносное русло и осуществляют отдаленное метастазирование. Этот вопрос требует дальнейшего исследования, которое выходит за рамки настоящей работы. Скорее всего, появление новых мутантных клонов носит случайный характер и не зависит от количества клеток в опухоли (в частности от размера опухоли). В случаях гетерогенных опухолей

клинически эффективная на первых этапах химио- или таргетная терапия, может уничтожать доминантные опухолевые клоны и, в некоторых случаях, способствовать освобождению пространства, пролиферации минорных резистентных к химиотерапии субпопуляций и/или дальнейшей клональной эволюции, приводящей к опухолевой прогрессии.

Была проанализирована частота повышения и снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ в зависимости от уменьшения или увеличения частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов. Провели и обратный анализ зависимости изменений частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов от изменения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Установлено, что в 56-80% случаев при уменьшении под действием химиопрепаратов частоты амплификаций (но не делеций), CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов, наблюдается снижение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* и наоборот, при снижении экспрессии в 73-85% случаев отмечается элиминация опухолевых клонов. Это свидетельствует о тесной взаимосвязи, именно взаимосвязи фактора снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ и элиминации опухолевых клонов под действием химиопрепаратов, которое выражается в сокращении мутантной ДНК. Наши результаты усложняют причинно-следственные связи выдвинутого предположения о том, что снижение экспрессии генов ABC обусловлено уменьшением во время химиотерапии количества опухолевых клеток, экспрессирующих гены ABC вследствие некроза (апоптоза или другой формы гибели) клеток. Установлено, что элиминация опухолевых клонов и делеция локусов ABC-транспортеров являются независимыми механизмами, которые могут приводить к снижению экспрессии генов МЛУ самостоятельно. Кроме того, независимо от элиминации опухолевых клонов и делеции локусов генов ABC, существует еще один самостоятельный механизм, связанный со снижением экспрессии генов лекарственной устойчивости, который действует в ответ на химиотерапию. Этот механизм обусловлен амплификацией региона 3p12.3, в котором локализован ген *DAP4C* (death-associated protein 4C), усиливающий *MST1*-индуцированный апоптоз и стабилизирующий p53, который является негативным регулятором экспрессии ABC-транспортеров.

Таким образом, установлено, что предсуществующая МЛУ (низкий уровень экспрессии генов ABC) в опухоли до лечения не является причиной для элиминации опухолевых клонов в процессе химиотерапии. Получены данные, свидетельствующие о тесном взаимодействии фактора изменения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ и

изменения опухолевых клонов под действием химиопрепаратов. Примерно в 40% первичных опухолей благодаря небольшому количеству повреждений за счет несбалансированных хромосомных аномалий, сохраняются основные механизмы у-регуляции экспрессии ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты. После начала НАХТ, как и полагается, в опухолевых клетках повышается экспрессия ABC-транспортеров и формируется фенотип адаптивной множественной лекарственной устойчивости. Эти опухолевые клетки оказываются химиорезистентными и выживают в процессе НАХТ. При этом может происходить даже уменьшение объема опухоли, но, тем не менее, опухоль генетически не отвечает на лечение, поскольку паренхима и число мутантных клонов практически не изменяется или даже увеличивается. У этих больных неблагоприятный прогноз, особенно при увеличении числа мутантных клонов. Изменения числа мутантных клонов в процессе НАХТ вообще может стать новым универсальным прогностическим фактором для многих локализаций.

Примерно у 57% опухолей еще до начала лечения в клетках, наблюдается высокая частота несбалансированных хромосомных аномалий, которые приводят к значительным нарушениям в механизмах у-регуляции экспрессии генов ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты. У больных отмечается хороший ответ на НАХТ и благоприятный прогноз. Нами были идентифицированы некоторые нарушения в системе активации генов ABC, прежде всего это делеции локусов самих генов ABC-транспортеров (3q27, 4q22.1, 6p21.32, 7q21.1, 10q24, 11q13.2, 16p11.2, 16p13.1, 21q22.3), кроме того, это amp 1q23.3, amp 1q32.2, amp 1q44, del 11q22.3, del 13q14.2 (была установлена их ассоциация со снижением экспрессии отдельных генов ABC). Совершенно четко было показано, что при наличии делеции генов ABC-транспортеров в опухоли до лечения, опухолевые клоны с делециями генов ABC не сохраняются после НАХТ и элиминируются. Это приводит нас к выводу о том, что в начале курсов химиотерапии уничтожаются чувствительные опухолевые клоны с нарушениями у-регуляции, которые не способны ответить повышением экспрессии генов ABC-транспортеров на химиопрепараты и сформировать адаптивную МЛУ. Происходит значительное сокращение опухолевой паренхимы, числа мутантных клонов и в результате, в конце сеансов НАХТ, паренхиматозно-стромальное соотношение уменьшается. Было показана низкая экспрессия генов ABC в строме, по сравнению с опухолевой тканью, учитывая это уменьшение паренхиматозно-стромального соотношения будет приводить с низкой суммарной экспрессии, которую мы детектируем в опухолевой ткани в целом. В конечном счете, снижение экспрессии ABC-транспортеров в опухолевой ткани после НАХТ это отражение процессов элиминации опухолевых клонов с нарушениями у-регуляции экспрессии генов множественной

лекарственной устойчивости в ответ на химиотерапию и уменьшения паренхиматозно-стромального соотношения под действием химиопрепаратов. Дополнительные доказательства этому были получены при изучении белковой экспрессии ABC-транспортеров. Было установлено, что при снижении экспрессии мРНК гена ABC отмечается и низкая частота опухолевых клеток, экспрессирующих белок ABC в опухоли после НАХТ.

Основная идея состоит в том, что, в большинстве случаев, нет особых механизмов снижения экспрессии генов ABC в клетках, а нарушены механизмы up-регуляции, т.е. ответа опухоли на химиопрепараты, оценивая их до лечения можно прогнозировать эффективность НАХТ. Этот вывод имеет еще одно интересное практическое следствие. Для того, чтобы регулировать формирование множественной лекарственной устойчивости опухоли, не надо ингибировать продукты генов ABC-транспортеров, а надо нарушить механизмы up-регуляции их экспрессии в опухолевых клетках. Для этого могут быть использованы разные подходы, начиная от простых ингибиторов сигнальных путей или довольно простой вариант – сочетание таргетных препаратов, ингибирующих внутриклеточные сигнальные пути (например, mTOR сигнальный каскад), и конвенциональных лекарственных средств, которые и будут оказывать основное противоопухолевое действие в условиях нарушения за счет таргетных препаратов механизмов up-регуляции экспрессии ABC-транспортеров и формирования адаптивной МЛУ. Это может стать новой стратегией управления множественной лекарственной устойчивостью опухоли.

Наконец последний вариант – это истинное снижение экспрессии генов ABC-транспортеров в опухолевых клетках в процессе НАХТ около 3% опухолей. Не изменяется частота CNA, опухолевая паренхима и число мутантных клонов. Отсутствуют делеции локусов ABC-транспортеров. Определяется наличием уникальной хромосомной аномалией – амплификации региона 3p12.3, в котором среди прочих генов локализован *DAP4*, усиливающий *MST1*-индуцированный апоптоз и стабилизирующий p53, являющегося негативным регулятором экспрессии ABC-транспортеров. Однако этот механизм еще нуждается в экспериментальной проверке. Еще одним дополнительным фактором, который может определять истинное снижение экспрессии ABC-транспортеров, это делеция локуса 17q13.1, содержащего ген-супрессор опухолевого роста *TP53*.

Таким образом, решена важная научная проблема – выявлены основные причины и факторы вариабельности индивидуального клинического ответа опухоли на химиотерапевтическое лечение, установлены закономерности развития множественной

лекарственной устойчивости, идентифицированы новые прогностические и предсказательные факторы, которые позволяют заложить основы персонифицированного подхода к назначению НАХТ больным РМЖ и разработки оригинальной стратегии управления множественной лекарственной устойчивостью опухоли.

ВЫВОДЫ

1. Экспрессия генов ABC-транспортеров до лечения слабо ассоциирована с основными клинико-патологическими параметрами. С эффективностью НАХТ связаны изменения экспрессии ABC-транспортеров: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *MVP*, *ABCG1* и *ABCG2* в опухоли в процессе лечения, которые определяют формирование адаптивной МЛУ. У пациентов со снижением уровня экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ в 61-84% случаев отмечен клинический эффект химиотерапии. Повышение экспрессии ABC-транспортеров в опухоли в процессе химиотерапии обуславливает формирование адаптивной МЛУ и сопряжено с отсутствием ответа в 63-88 % случаев.
2. У пациентов, в опухоли которых выявлено повышение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в процессе НАХТ, показатели безметастатической выживаемости составили 50-55%, что существенно ниже, чем у больных со снижением экспрессии этих генов – 73-78% (log-rank test $p = 0,032-0,0061$). Это свидетельствует о благоприятном прогностическом значении снижения экспрессии ABC-транспортеров и неблагоприятном – повышения уровня их экспрессии в процессе химиотерапии.
3. Выявлен градиентный феномен, представляющий собой однонаправленное изменение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* в соответствии с эффектом НАХТ, наличие которого у пациента является благоприятным прогностическим признаком. Безметастатическая выживаемость больных с наличием градиентного феномена составила 73% против 39% (log-rank test $p=0,0018$) у больных без градиентного феномена с разнонаправленным изменением экспрессии этих генов.
4. Установлено, что продолжительность периода адаптивной МЛУ, обусловленной повышением экспрессии ABC-транспортеров, может достигать трех месяцев после окончания введения химиопрепаратов, при этом уровень экспрессии генов ABC в операционном материале не зависит от продолжительности периода после окончания курсов химиотерапии. У некоторых пациентов экспрессия ABC-транспортеров в опухоли может понижаться, относительно исходного уровня до лечения, уже на 7-е сутки от начала 1 курса НАХТ, что доказывает существование феномена снижения экспрессии генов ABC под действием химиопрепаратов в условиях клинической опухоли, который не определяется естественной нормализацией экспрессии после окончания воздействия.
5. У больных со снижением экспрессии мРНК генов *ABCG2*, *ABCC1*, *ABCB1* и *MVP* в опухоли молочной железы выявлен низкий уровень опухолевых клеток в операционном материале, экспрессирующих кодируемые этими генами белки: Mvp, Vscr, Mrp1 и Р-гликопротеин, по сравнению с пациентами, у которых экспрессия мРНК генов ABC-

транспортеров в процессе НАХТ повышается, что подтверждает феномен снижения экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ на уровне белков.

6. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность, обусловленная наличием в инфильтративном компоненте альвеолярных, трабекулярных, тубулярных, солидных структур и дискретных групп клеток, не оказывает существенного влияния на экспрессию и изменение экспрессии основных ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Одним из факторов повышенной химиорезистентности опухоли с наличием альвеолярных и трабекулярных структур является низкий уровень экспрессии гена *ABCB3*, участвующего в презентации антигенов вместе и молекулами МНС1. Такой же низкий уровень экспрессии *ABCB3* обнаруживается в опухоли до лечения у больных с отсутствием ответа на НАХТ, в то время как у больных с объективным ответом отмечается высокая экспрессия *ABCB3*.

7. При гипометилировании промоторных регионов генов *ABCB1*, *MVP* и *ABCG2* в опухоли больных до лечения и после НАХТ показана высокая экспрессия этих генов. Установлены случаи гиперметилирования промоторных регионов данных генов в опухоли до лечения. Гиперметилирование промоторов генов МЛУ приводит к низкой экспрессии генов МЛУ в опухоли до лечения, но не оказывает существенного влияния на изменение экспрессии этих генов в процессе проведения НАХТ и не определяет снижение экспрессии генов с гиперметилированными промоторами в процессе НАХТ. По существу, уровень метилирования промоторных областей генов МЛУ обуславливает только исходный уровень их экспрессии в опухоли до лечения, который формирует фенотип предсуществующей МЛУ.

8. Полиморфизм в кодирующем регионе гена опухолевой супрессии *TP53+119C>G Arg72Pro* rs1042522 связан с эффектом НАХТ и экспрессией генов ABC-транспортеров. Носители дикого *Arg/Arg* генотипа rs1042522 хорошо отвечают на НАХТ, у них наблюдается низкая экспрессия генов *ABCC1* и *ABCC5* в образцах опухоли после НАХТ и чаще снижается экспрессия генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP* в процессе НАХТ, по сравнению с пациентами с *Arg/Pro* и *Pro/Pro* генотипами. Делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* является благоприятным прогностическим признаком, сочетается с *Arg/Arg* генотипом rs1042522, при этом в 1,6 раза чаще отмечается снижение экспрессии генов ABC в процессе НАХТ, по сравнению с пациентами с нормальным состоянием локуса 17p13.1.

9. В подавляющем большинстве случаев (75%-100%) при делеции локусов генов ABC-транспортеров в опухоли до лечения их экспрессия в процессе химиотерапии снижается, а уровень экспрессии в образцах опухоли после НАХТ в 2,5-7,5 раз ниже, чем

у больных с нормальным состоянием локусов. Делецией локуса можно объяснить до половины случаев снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ, поскольку, у 9-49% пациентов со снижением экспрессии того или иного гена ABC наблюдалась делеция его локуса. У 85% (29/34) больных с делецией хотя бы одного локуса гена ABC-транспортера наблюдается делеция в регионе 13q14.2 (против 9% (3/34) случаев у больных без делеций локусов генов МЛУ, $p = 2.03 \times 10^{-11}$, по критерию Фишера). Все пациенты с делециями локусов генов *ABCB1* (7q21.1), *ABCB3* (6p21.32) и *ABCC5* (3q27) ответили на НАХТ. Объективный клинический ответ на НАХТ у больных РМЖ с делециями локусов генов *ABCC1* (16p13.1), *ABCC2* (10q24), *ABCG1* (21q22.3) и *ABCG2* (4q22.1) наблюдался у 62% – 88% пациентов.

10. Идентифицированы хромосомные локусы, aberrации в которых сопряжены со снижением экспрессии каждого ABC-транспортера в отдельности. Снижение генной экспрессии определяют следующие хромосомные аномалии: амплификации 1q32.2 и 1q23.3, делеции 11q22.3 и 17q13.1, в то время как повышение экспрессии генов ABC в процессе НАХТ определяет нормальное состояние этих локусов. При снижении экспрессии генов *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2* и *MVP* в процессе НАХТ уровень делеций и CNA в целом в опухоли до лечения значительно выше (почти в два раза) по сравнению с больными, у которых отмечено повышение экспрессии генов. Это свидетельствует о том, что снижение экспрессии ABC-транспортеров под действием химиопрепаратов обусловлено нарушением механизмов их up-регуляции и является характерным для клинической опухоли aberrантным явлением.

11. Изменение частоты CNA, содержания опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов в процессе НАХТ коррелирует с изменением объема первичного опухолевого узла в ответ на химиотерапию ($r = 0,54-0,72$, $p < 0,05$) и отражает изменение (элиминацию или новообразование) опухолевых клонов в процессе химиотерапии и генетическую эффективность НАХТ. В 56-80% случаев при элиминации под действием химиопрепаратов опухолевых клонов наблюдается снижение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* и наоборот, при снижении экспрессии в 73-85% случаев отмечается элиминация опухолевых клонов. Это свидетельствует о тесной взаимосвязи фактора снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ и элиминации опухолевых клонов под действием химиопрепаратов, которое выражается в уменьшении представленности мутантной ДНК.

12. В 40% первичных опухолей благодаря небольшому количеству повреждений за счет несбалансированных хромосомных аномалий, сохраняются основные механизмы up-регуляции экспрессии ABC-транспортеров и в ответ на химиопрепараты формируется

адаптивная МЛУ. Более чем в половине опухолей выявлена высокая частота несбалансированных хромосомных аномалий, которые приводят к значительным нарушениям систем активации экспрессии генов ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты (делеции локусов самих генов ABC-транспортеров (3q27, 4q22.1, 6p21.32, 7q21.1, 10q24, 11q13.2, 16p11.2, 16p13.1, 21q22.3), амплификации 1q23.3, 1q32.2, 1q44, делеции 11q22.3, 13q14.2 – связаны со снижением экспрессии отдельных генов ABC). Опухолевые клоны с указанными нарушениями в большинстве случаев после НАХТ элиминируются, что приводит к значительному сокращению содержания опухолевой паренхимы, числа мутантных клонов. В результате этого в конце сеансов НАХТ паренхиматозно-стромальное соотношение уменьшается, обеспечивая низкую суммарную экспрессию генов МЛУ в опухолевой ткани в целом. Истинное снижение экспрессии генов ABC-транспортеров в опухолевых клетках в процессе НАХТ обнаруживается в единичных опухолях и обусловлено амплификацией региона 3p12.3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вторушин С.В. Клинико-морфологические особенности мультицентрического роста и рецидивирования при раке молочной железы// Автореферат диссертации на соискание уч. степени докт. мед. наук.- Томск 2011.
2. Вторушин С.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Завьялова М.В. Особенности различных форм опухолевой прогрессии при мультицентрическом/мультифокусном росте рака молочной железы // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т.102, №3.- С.70-27.
3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2009 г // Вестник РОНЦ им. НН Блохина РАМН. – 2011. – Т.22, №3. – С.1-172.
4. Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Вторушин С.В., Стахеева М.Н., Савенкова О.В., Крицкая Н.Н., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Взаимосвязь чувствительности опухоли к неоадьювантной химиотерапии с морфологическим строением первичного опухолевого узла при уницентрическом инфильтрирующем протоковом раке молочной железы // Сибирский онкологический журнал. – 2008. №6. – С.30-34.
5. Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Вторушин С.В., Гарбуков Е.Ю., Глущенко С.А. Сопряженность лимфогенного метастазирования и гистологического строения инфильтративного компонента протокового рака молочной железы // Сибирский онкологический журнал. – 2006. – V. 1. – P. 32-35.
6. Загрекова Е.И., Мещеряков А.А. Лекарственное лечение рака молочной железы // Русский медицинский журнал. – 2002. – V. 10, N 14. – P. 605-608.
7. 423. Имянитов Е. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. – 2010. – V. 11, N 4. – P. 258-259.
8. Литвяков Н.В.; Гончарик О.О.; Межерицкий С.А.; Васильева Е.О.; Карпов А.Б.; Тахауов Р.М. Генетические аспекты развития злокачественных новообразований в условиях длительного радиационного воздействия. Человечество и радиация. / . – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2009. Человечество и радиация. – 130 с.
9. Новик А.В., Моисеенко В.М. Теоретические предпосылки адьювантной терапии злокачественных опухолей // Практическая онкология. – 2007. – V. 8, N 3. – P. 109-117.
10. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Савенкова О.В. Взаимосвязь морфологической гетерогенности инфильтрирующего протокового рака молочной железы с различными формами опухолевой прогрессии // Сибирский онкологический журнал. – 2007. – № 3. – С.58-64.
11. Писарева Л.Ф., Одинцова И.Н., Гольдин В.Д. Социально-экономический ущерб, обусловленный смертностью от рака молочной железы в Томской области // Сибирский онкологический журнал. – 2008. Прил. 2. – С. 70-71.
12. Семиглазов В.Ф. Стратегические и практические подходы к решению проблемы рака молочной железы.// Вопросы онкологии. - 2012. Т. 58. № 2. С. 148-152.
13. Семиглазов В.Ф, Топузов Э.Э. Рак молочной железы. М.: МЕДпресс-информ, 2009.– 176 с. – 2009.
14. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Дашян Г., Бессонов А., Палтуев Р., Семиглазова Т., Гречухина И., Пеньков К., Васильев А., Манихас А. Опухолевые маркеры при раке молочной железы // Врач. – 2011. №12.- С.2-7.
15. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Клетсель А.Е.: Неоадьювантное и адьювантное лечение рака молочной железы. Учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей/ М.: Медицинское информационное агенство, 2008.- 287 с.
16. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии. – 2007. – Т.47. – С.3-52.

17. Ahmed F.E. Molecular markers that predict response to colon cancer therapy 2005 – 375p.
18. Ahmed N., Thompson E.W., Quinn M.A. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm // *J Cell Physiol.* – 2007. – V. 213, N 3. – P. 581-588.
19. Allen J.D., Brinkhuis R.F., van Deemter L., Wijnholds J., Schinkel A.H. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance // *Cancer Research.* – 2000. – V. 60, N 20. – P. 5761-5766.
20. Allen J.D., Schinkel A.H. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) // *Mol Cancer Ther.* – 2002. – V. 1, N 6. – P. 427-434.
21. Ambudkar S.V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z.E., Gottesman M.M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism // *Oncogene.* – 2003. – V. 22, N 47. – P. 7468-7485.
22. Amiri-Kordestani L., Basseville A., Kurdziel K., Fojo A.T., Bates S.E. Targeting MDR in breast and lung cancer: Discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies // *Drug Resistance Updates.* – 2012.
23. Anghel S.I., Correa-Rochal R., Budinska E., Boliganl K.F., Abraham S., Colombetti S., Fontao L., Mariotti A., Rimoldi D., Ghanem G.E. Breast cancer suppressor candidate-1 (BCSC-1) is a melanoma tumor suppressor that down regulates MITF // *Pigment Cell & Melanoma Research.* – 2012. – V. 25, N 4. – P. 482-487.
24. Atalay C. Locally Advanced Breast Cancer: Multidrug Resistance // *Methods of Cancer Diagnosis, Therapy and Prognosis.* – 2008. – P. 637-652.
25. Atalay C., Deliloglu Gurhan I., Irkkan C., Gunduz U. Multidrug resistance in locally advanced breast cancer // *Tumour Biol.* – 2006. – V. 27, N 6. – P. 309-318.
26. Austin Doyle L., Ross D.D. Multidrug resistance mediated by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) // *Oncogene.* – 2003. – V. 22, N 47. – P. 7340-7358.
27. Baker E.K., Johnstone R.W., Zalcborg J.R., El-Osta A. Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs // *Oncogene.* – 2005. – V. 24, N 54. – P. 8061-8075.
28. Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Paraskeva C., Markowitz S., Willson J., Hamilton S., Vogelstein B. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis // *Cancer Research.* – 1990. – V. 50, N 23. – P. 7717-7722.
29. Bateman A.C. Breast pathology // *Surgery (Oxford).* – 2007. – V. 25, N 6. – P. 245-250.
30. Belinsky M.G., Bain L.J., Balsara B.B., Testa J.R., Kruh G.D. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins // *Journal of the National Cancer Institute.* – 1998. – V. 90, N 22. – P. 1735-1741.
31. Bergamaschi A., Kim Y.H., Wang P., Sørliie T., Hernandez-Boussard T., Lonning P.E., Tibshirani R., Børresen-Dale A.L., Pollack J.R. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer // *Genes, Chromosomes and Cancer.* – 2006. – V. 45, N 11. – P. 1033-1040.
32. Bertheau P., Lerebours F., Mounier N., de Roquancourt A., Espie M., Clot P., Servant J.M., Misset J.L., Marty M., Janin A. Prognostic significance of a combined clinicopathologic score for response to primary systemic therapy in locally advanced breast cancer // *Oncol Rep.* – 2005. – V. 14, N 2. – P. 513-520.
33. Bertos N.R., Park M. Breast cancer - one term, many entities? // *J Clin Invest.* – 2011. – V. 121, N 10. – P. 3789-3796.
34. Bhatia S., Frangioni J.V., Hoffman R.M., Iafrate A.J., Polyak K. The challenges posed by cancer heterogeneity // *Nature biotechnology.* – 2012. – V. 30, N 7. – P. 604-610.
35. Bhushan A., Abramson R., Chiu J., Tritton T.R. Expression of c-fos in human and murine multidrug-resistant cells // *Molecular pharmacology.* – 1992. – V. 42, N 1. – P. 69-74.
36. Bloom H., Richardson W. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years // *British Journal of Cancer.* – 1957. – V. 11, N 3. – P. 359.

37. Bonadonna G., Valagussa P., Brambilla C., Ferrari L., Moliterni A., Terenziani M., Zambetti M. Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute // *J Clin Oncol.* – 1998. – V. 16, N 1. – P. 93-100.
38. Borst P., Elferink R.O. Mammalian ABC transporters in health and disease // *Annual review of biochemistry.* – 2002. – V. 71, N 1. – P. 537-592.
39. Bottini A., Berruti A., Bersiga A., Brizzi M.P., Brunelli A., Gorzegno G., DiMarco B., Aguggini S., Bolsi G., Cirillo F. p53 but not bcl-2 immunostaining is predictive of poor clinical complete response to primary chemotherapy in breast cancer patients // *Clinical Cancer Research.* – 2000. – V. 6, N 7. – P. 2751-2758.
40. Bourdon J.-C., Khoury M.P., Diot A., Baker L., Fernandes K., Aoubala M., Quinlan P., Purdie C.A., Jordan L.B., Prats A.-C. p53 mutant breast cancer patients expressing p53g have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients // *Breast Cancer Res.* – 2011. – V. 13. – P. R7.
41. Brandt B., Junker R., Griwatz C., Heidl S., Brinkmann O., Semjonow A., Assmann G., Zanker K.S. Isolation of prostate-derived single cells and cell clusters from human peripheral blood // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56, N 20. – P. 4556-4561.
42. Brooks A.R., Harkins R.N., Wang P., Qian H.S., Liu P., Rubanyi G.M. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle // *J Gene Med.* – 2004. – V. 6, N 4. – P. 395-404.
43. Brooks T., Minderman H., O'Loughlin K.L., Pera P., Ojima I., Baer M.R., Bernacki R.J. Taxane-based reversal agents modulate drug resistance mediated by P-glycoprotein, multidrug resistance protein, and breast cancer resistance protein // *Molecular Cancer Therapeutics.* – 2003. – V. 2, N 11. – P. 1195-1205.
44. Burcombe R., Makris A., Richman P., Daley F., Noble S., Pittam M., Wright D., Allen S., Dove J., Wilson G. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer // *British Journal of Cancer.* – 2004. – V. 92, N 1. – P. 147-155.
45. Burger H., Foekens J.A., Look M.P., Meijer-van Gelder M.E., Klijn J.G., Wiemer E.A., Stoter G., Nooter K. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response // *Clin Cancer Res.* – 2003. – V. 9, N 2. – P. 827-836.
46. Burris H.A., Rugo H.S., Vukelja S.J., Vogel C.L., Borson R.A., Limentani S., Tan-Chiu E., Krop I.E., Michaelson R.A., Girish S. Phase II study of the antibody drug conjugate trastuzumab-DM1 for the treatment of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer after prior HER2-directed therapy // *Journal of Clinical Oncology.* – 2011. – V. 29, N 4. – P. 398-405.
47. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T., Grzybowska E., Budryk M., Stawicka M., Mierzwa T., Szwiec M., Wiśniowski R., Siolek M. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy // *Journal of Clinical Oncology.* – 2010. – V. 28, N 3. – P. 375-379.
48. Cai H., Kumar N., Baudis M. arraymap: A reference resource for genomic copy number imbalances in human malignancies // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7, N 5. – P. e36944.
49. Carey L., Winer E., Viale G., Cameron D., Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? // *Nature reviews Clinical oncology.* – 2010. – V. 7, N 12. – P. 683-692.
50. Caudle A.S., Gonzalez-Angulo A.M., Hunt K.K., Liu P., Pusztai L., Symmans W.F., Kuerer H.M., Mittendorf E.A., Hortobagyi G.N., Meric-Bernstam F. Predictors of tumor progression during neoadjuvant chemotherapy in breast cancer // *J Clin Oncol.* – 2010. – V. 28, N 11. – P. 1821-8.

51. Chan H.S., Sun A., Hoheisel G.B. Endobronchial tuberculosis--is corticosteroid treatment useful? A report of 8 cases and review of the literature // *Postgrad Med J.* – 1990. – V. 66, N 780. – P. 822-6.
52. Chang H., Rha S., Jeung H.C., Im C.K., Ahn J., Kwon W., Yoo N., Roh J., Chung H. Association of the ABCB1 gene polymorphisms 2677G> T/A and 3435C> T with clinical outcomes of paclitaxel monotherapy in metastatic breast cancer patients // *Annals of Oncology.* – 2009. – V. 20, N 2. – P. 272-277.
53. Chang J.C., Wooten E.C., Tsimelzon A., Hilsenbeck S.G., Gutierrez M., Elledge R., Mohsin S., Osborne C.K., Chamness G.C., Allred D.C. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer // *The Lancet.* – 2003. – V. 362, N 9381. – P. 362-369.
54. Cheang M.C.U., Chia S.K., Voduc D., Gao D., Leung S., Snider J., Watson M., Davies S., Bernard P.S., Parker J.S. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer // *Journal of the National Cancer Institute.* – 2009. – V. 101, N 10. – P. 736-750.
55. Chekhun V.F., Kulik G.I., Yurchenko O.V., Tryndyak V.P., Todor I.N., Luniv L.S., Tregubova N.A., Pryzimirska T.V., Montgomery B., Rusetskaya N.V., Pogribny I.P. Role of DNA hypomethylation in the development of the resistance to doxorubicin in human MCF-7 breast adenocarcinoma cells // *Cancer Lett.* – 2006. – V. 231, N 1. – P. 87-93.
56. Chen K.G., Sikic B.I. Molecular Pathways: Regulation and Therapeutic Implications of Multidrug Resistance // *Clinical Cancer Research.* – 2012. – V. 18, N 7. – P. 1863-1869.
57. Chen K.G., Wang Y.C., Schaner M.E., Francisco B., Durán G.E., Juric D., Huff L.M., Padilla-Nash H., Ried T., Fojo T. Genetic and epigenetic modeling of the origins of multidrug-resistant cells in a human sarcoma cell line // *Cancer Research.* – 2005. – V. 65, N 20. – P. 9388-9397.
58. Cherdyntseva N., Gervas P., Litviakov N., Stakcheeva M., Ponomaryeva A., Dobrodeev A.Y., Denisov E., Belyavskaya V., Choinzonov E. Age-related function of tumor suppressor gene TP53: contribution to cancer risk and progression // *Experimental Oncology.* – 2010. – V. 32, N 3. – P. 205-208.
59. Chevillard S., Pouillart P., Beldjord C., Asselain B., Beuzeboc P., Magdelénat H., Vielh P. Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy // *Cancer.* – 1996. – V. 77, N 2. – P. 292-300.
60. Chin K.-V., Ueda K., Pastan I., Gottesman M.M. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53 // *Science.* – 1992. – V. 255, N 5043. – P. 459-462.
61. Chin K.V., Ueda K., Pastan I., Gottesman M.M. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53 // *Science.* – 1992. – V. 255, N 5043. – P. 459-62.
62. Chin S.F., Teschendorff A.E., Marioni J.C., Wang Y., Barbosa-Morais N.L., Thorne N.P., Costa J.L., Pinder S.E., van De Wiel M.A., Green A.R. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer // *Genome Biol.* – 2007. – V. 8, N 10. – P. R215.
63. Chintamani, Singh J.P., Mittal M.K., Saxena S., Bansal A., Bhatia A., Kulshreshtha P. Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer--a prospective clinical study // *World J Surg Oncol.* – 2005. – V. 3. – P. 61-71.
64. Ciocca D.R., Arrigo A.P., Calderwood S.K. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update // *Arch Toxicol.* – 2013. – V. 87, N 1. – P. 19-48.
65. Clark G.M. Prognostic and predictive factors for breast cancer // *Breast Cancer.* – 1995. – V. 2, N 2. – P. 79-89.
66. Clarke R., Leonessa F., Trock B. Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: review and meta-analysis // *Semin Oncol.* – 2005. – V. 32, N 6 Suppl 7. – P. S9-15.

67. Cleator S., Makris A., Ashley S., Lal R., Powles T. Good clinical response of breast cancers to neoadjuvant chemoendocrine therapy is associated with improved overall survival // *Annals of Oncology*. – 2005. – V. 16, N 2. – P. 267-272.
68. Climent J., Dimitrow P., Fridlyand J., Palacios J., Siebert R., Albertson D.G., Gray J.W., Pinkel D., Lluch A., Martinez-Climent J.A. Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer // *Cancer Research*. – 2007. – V. 67, N 2. – P. 818-826.
69. Cole S., Bhardwaj G., Gerlach J., Mackie J., Grant C., Almquist K., Stewart A., Kurz E., Duncan A., Deeley R. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line // *Science*. – 1992. – V. 258, N 5088. – P. 1650-1654.
70. Cole S.P., Sparks K.E., Fraser K., Loe D.W., Grant C.E., Wilson G.M., Deeley R.G. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells // *Cancer Research*. – 1994. – V. 54, N 22. – P. 5902-5910.
71. Coombs N.J., Boyages J. Multifocal and multicentric breast cancer: does each focus matter? // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. – V. 23, N 30. – P. 7497-7502.
72. D'Alessandro R., Roselli M., Ferroni P., Mariotti S., Spila A., Aloe S., Carone M.D., Abbolito M.R., Carlini S., Perri P. Serum tissue polypeptide specific antigen (TPS): a complementary tumor marker to CA 15-3 in the management of breast cancer // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2001. – V. 68, N 1. – P. 9-19.
73. Dahabreh I.J., Linardou H., Bouzika P., Varvarigou V., Murray S. TP53 Arg72Pro polymorphism and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. – 2010. – V. 19, N 7. – P. 1840-7.
74. Dai S., Mao C., Jiang L., Wang G., Cheng H. P53 polymorphism and lung cancer susceptibility: a pooled analysis of 32 case-control studies // *Human Genetics*. – 2009. – V. 125, N 5-6. – P. 633-638.
75. Deeley R.G., Cole S.P. Function, evolution and structure of multidrug resistance protein (MRP) // *Semin Cancer Biol*. – 1997. – V. 8, N 3. – P. 193-204.
76. Dejeux E., Ronneberg J.A., Solvang H., Bukholm I., Geisler S., Aas T., Gut I.G., Borresen-Dale A.L., Lonning P.E., Kristensen V.N., Tost J. DNA methylation profiling in doxorubicin treated primary locally advanced breast tumours identifies novel genes associated with survival and treatment response // *Mol Cancer*. – 2010. – V. 9. – P. 68.
77. Denisov E.V., Cherdyntseva N.V., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Malinovskaya E.A., Voevoda M.I., Belyavskaya V.A., Stegny V.N. TP53 mutations and Arg72Pro polymorphism in breast cancers // *Cancer genetics and cytogenetics*. – 2009. – V. 192, N 2. – P. 93-95.
78. Denisov E.V., Sukhanovskaya T.V., Dultseva T.S., Malinovskaya E.A., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Choinzonov E.L., Cherdyntseva N.V. Coordination of TP53 Abnormalities in Breast Cancer: Data from Analysis of TP53 Polymorphisms, Loss of Heterozygosity, Methylation, and Mutations // *Genet Test Mol Biomarkers*. – 2011 V.15(12): 901-907. doi:10.1089/gtmb.2011.0038
79. Denisov E.V., Litviakov N.V., Zavyalova M.V., Perelmuter V.M., Vtorushin S.V., Tsyganov M.M., Gerashchenko T.S., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression // *Scientific reports*. – 2014. – V. 4 4709.- P.1-7. doi:10.1038/srep04709.
80. Desgrosellier J.S., Cheres D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities // *Nature Reviews Cancer*. – 2010. – V. 10, N 1. – P. 9-22.
81. Desiderato L., Davey M.W., Piper A.A. Demethylation of the humanMDR1 5' region accompanies activation of P-glycoprotein expression in a HL60 multidrug resistant subline // *Somatic cell and molecular genetics*. – 1997. – V. 23, N 6. – P. 391-400.
82. Desoize B., Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? // *Crit Rev Oncol Hematol*. – 2000. – V. 36, N 2-3. – P. 193-207.

83. Dexter D.L., Kowalski H.M., Blazar B.A., Fligiel Z., Vogel R., Heppner G.H. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor // *Cancer Res.* – 1978. – V. 38, N 10. – P. 3174-3181.
84. Dittmer D., Pati S., Zambetti G., Chu S., Teresky A.K., Moore M., Finlay C., Levine A.J. Gain of function mutations in p53 // *Nat Genet.* – 1993. – V. 4, N 1. – P. 42-46.
85. Dixon A., Bell J., Ellis I., Elston C., Blamey R. P-glycoprotein expression in locally advanced breast cancer treated by neoadjuvant chemotherapy // *British Journal of Cancer.* – 1992. – V. 66, N 3. – P. 537-541.
86. Döhner H., Stilgenbauer S., Benner A., Leupolt E., Kröber A., Bullinger L., Döhner K., Bentz M., Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia // *New England Journal of Medicine.* – 2000. – V. 343, N 26. – P. 1910-1916.
87. Dorai T., Aggarwal B.B. Role of chemopreventive agents in cancer therapy // *Cancer Lett.* – 2004. – V. 215, N 2. – P. 129-140.
88. Ebeling F., Stieber P., Untch M., Nagel D., Konecny G., Schmitt U., Fateh-Moghadam A., Seidel D. Serum CEA and CA 15-3 as prognostic factors in primary breast cancer // *British Journal of Cancer.* – 2002. – V. 86, N 8. – P. 1217-1222.
89. Eechoute K., Sparreboom A., Burger H., Franke R.M., Schiavon G., Verweij J., Loos W.J., Wiemer E.A.C., Mathijssen R.H.J. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice // *Clinical Cancer Research.* – 2011. – V. 17, N 3. – P. 406-415.
90. Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little // *Oncogene.* – 2002. – V. 21, N 35. – P. 5400-5413.
91. El-Osta A., Baker E.K., Wolffe A.P. Profiling methyl-CpG specific determinants on transcriptionally silent chromatin // *Mol Biol Rep.* – 2001. – V. 28, N 4. – P. 209-215.
92. El-Osta A., Kantharidis P., Zalberg J.R., Wolffe A.P. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation // *Molecular and cellular biology.* – 2002. – V. 22, N 6. – P. 1844-1857.
93. El-Osta A., Kantharidis P., Zalberg J.R., Wolffe A.P. Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation // *Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 22, N 6. – P. 1844-1857.
94. El Azreq M.A., Naci D., Aoudjit F. Collagen/ β 1 integrin signaling up-regulates the ABCC1/MRP-1 transporter in an ERK/MAPK-dependent manner // *Molecular Biology of the Cell.* – 2012. – V. 23, N 17. – P. 3473-3484.
95. Elston C., Ellis I. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up // *Histopathology.* – 1991. – V. 19, N 5. – P. 403-410.
96. Faneyte I.F., Kristel P.M., Maliapaard M., Scheffer G.L., Scheper R.J., Schellens J.H., van de Vijver M.J. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer // *Clin Cancer Res.* – 2002. – V. 8, N 4. – P. 1068-1074.
97. Faneyte I.F., Kristel P.M., van de Vijver M.J. Determining MDR1/P-glycoprotein expression in breast cancer // *Int J Cancer.* – 2001. – V. 93, N 1. – P. 114-122.
98. Faneyte I.F., Kristel P.M., van de Vijver M.J. Multidrug resistance associated genes MRP1, MRP2 and MRP3 in primary and anthracycline exposed breast cancer // *Anticancer Res.* – 2004. – V. 24, N 5A. – P. 2931-2939.
99. Faneyte I.F., Schrama J.G., Peterse J.L., Remijnse P.L., Rodenhuis S., Van de Vijver M. Breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy: predictive markers and relation with outcome // *British Journal of Cancer.* – 2003. – V. 88, N 3. – P. 406-412.
100. Fernandez-Sanchez M., Gamboa-Dominguez A., Uribe N., Garcia-Ulloa A.C., Flores-Estrada D., Candelaria M., Arrieta O. Clinical and pathological predictors of the response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer // *Med Oncol.* – 2006. – V. 23, N 2. – P. 171-183.

101. Ferriere J.P., Assier I., Cure H., Charrier S., Kwiatkowski F., Achard J.L., Dauplat J., Chollet P. Primary chemotherapy in breast cancer: correlation between tumor response and patient outcome // *Am J Clin Oncol.* – 1998. – V. 21, N 2. – P. 117-120.
102. Filipits M., Pohl G., Rudas M., Dietze O., Lax S., Grill R., Pirker R., Zielinski C.C., Hausmaninger H., Kubista E. Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group // *Journal of Clinical Oncology.* – 2005. – V. 23, N 6. – P. 1161-1168.
103. Fisher B., Bryant J., Wolmark N., Mamounas E., Brown A., Fisher E.R., Wickerham D.L., Begovic M., DeCillis A., Robidoux A., Margolese R.G., Cruz A.B., Jr., Hoehn J.L., Lees A.W., Dimitrov N.V., Bear H.D. Effect of preoperative chemotherapy on the outcome of women with operable breast cancer // *J Clin Oncol.* – 1998. – V. 16, N 8. – P. 2672-2685.
104. Fisher R., Pusztai L., Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics // *Br J Cancer.* – 2013. – V. 108, N 3. – P. 479-485.
105. Flahaut M., Mühlethaler-Mottet A., Martinet D., Fattet S., Bourlout K.B., Auderset K., Meier R., Schmutz N.B., Delattre O., Joseph J.M. Molecular cytogenetic characterization of doxorubicin-resistant neuroblastoma cell lines: Evidence that acquired multidrug resistance results from a unique large amplification of the 7q21 region // *Genes, Chromosomes and Cancer.* – 2006. – V. 45, N 5. – P. 495-508.
106. Flens M.J., Zaman G., Van der Valk P., Izquierdo M.A., Schroeijers A.B., Scheffer G.L., Van der Groep P., de Haas M., Meijer C., Scheper R.J. Tissue distribution of the multidrug resistance protein // *The American journal of pathology.* – 1996. – V. 148, N 4. – P. 1237.
107. Fletcher J.I., Haber M., Henderson M.J., Norris M.D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps // *Nat Rev Cancer.* – 2010. – V. 10, N 2. – P. 147-156.
108. Fletcher J.I., Haber M., Henderson M.J., Norris M.D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps // *Nature Reviews Cancer.* – 2010. – V. 10, N 2. – P. 147-156.
109. Fojo A., Ueda K., Slamon D., Poplack D., Gottesman M., Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1987. – V. 84, N 1. – P. 265-269.
110. Fujii H., Marsh C., Cairns P., Sidransky D., Gabrielson E. Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56, N 7. – P. 1493-1497.
111. Gao L., Nieters A., Brenner H. Cell proliferation-related genetic polymorphisms and gastric cancer risk: systematic review and meta-analysis // *Eur J Hum Genet.* – 2009. – V. 17, N 12. – P. 1658-1667.
112. Gao P., Yang X., Xue Y.W., Zhang X.F., Wang Y., Liu W.J., Wu X.J. Promoter methylation of glutathione S-transferase p11 and multidrug resistance gene 1 in bronchioloalveolar carcinoma and its correlation with DNA methyltransferase 1 expression // *Cancer.* – 2009. – V. 115, N 14. – P. 3222-3232.
113. García M.G., Alaniz L., Lopes E.C., Blanco G., Hajos S.E., Alvarez E. Inhibition of NF- B activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines // *Leukemia research.* – 2005. – V. 29, N 12. – P. 1425-1434.
114. García M.G., Alaniz L., Lopes E.C., Blanco G., Hajos S.E., Alvarez E. Inhibition of NF- B activity by BAY 11-7082 increases apoptosis in multidrug resistant leukemic T-cell lines // *Leukemia research.* – 2005. – V. 29, N 12. – P. 1425-1434.
115. Gatz M.L., Lucas J.E., Barry W.T., Kim J.W., Wang Q., Crawford M.D., Datto M.B., Kelley M., Mathey-Prevot B., Potti A. A pathway-based classification of human breast cancer // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2010. – V. 107, N 15. – P. 6994-6999.
116. Geyer F.C., Weigelt B., Natrajan R., Lambros M.B., de Biase D., Vatcheva R., Savage K., Mackay A., Ashworth A., Reis-Filho J.S. Molecular analysis reveals a genetic basis for the phenotypic diversity of metaplastic breast carcinomas // *J Pathol.* – 2010. – V. 220, N 5. – P. 562-573.

117. Ghanem E., Fritzsche S., Al-Balushi M., Hashem J., Ghuneim L., Thomer L., Kalbacher H., van Endert P., Wiertz E., Tampé R. The transporter associated with antigen processing (TAP) is active in a post-ER compartment // *J Cell Sci.* – 2010. – V. 123, N 24. – P. 4271-4279.
118. Gillet J.P. S.J., Bertholet V., De Longueville F., Remacle J., Efferth T. Microarray expression profiling of ABC transporters in human breast cancer // *Cancer Genomics-Proteomics.* – 2006. – V. 3, N 2. – P. 97-106.
119. Gillet J.P., Efferth T., Remacle J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – V. 1775, N 2. – P. 237-62.
120. Gillet J.P., Gottesman M.M. Advances in the molecular detection of ABC transporters involved in multidrug resistance in cancer // *Current pharmaceutical biotechnology.* – 2011. – V. 12, N 4. – P. 686-674.
121. Gillet J.P., Gottesman M.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1 // *Drug Resist Updat.* – 2012. – V. 15, N 1-2. – P. 2-4.
122. GLOBOCAN 2008. Breast cancer incidence and mortality worldwide in 2008 // Available at: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>. – V. Accessed on February 25, 2011.
123. Glockner S., Buurman H., Kleeberger W., Lehmann U., Kreipe H. Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer // *Lab Invest.* – 2002. – V. 82, N 10. – P. 1419-1426.
124. Glubb D.M., Innocenti F. Mechanisms of genetic regulation in gene expression: examples from drug metabolizing enzymes and transporters // *WIREs Syst Biol Med.* – 2011. – V. 3. – P. 299–313.
125. Goldhirsch A., Ingle J., Gelber R., Coates A., Thürlimann B., Senn H.J. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009 // *Annals of Oncology.* – 2009. – V. 20, N 8. – P. 1319-1329.
126. Goldhirsch A., Winer E., Coates A., Gelber R., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.-J., Albain K.S., André F., Bergh J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 // *Annals of Oncology.* – 2013. – V. 24, N 9. – P. 2206-2223.
127. Goldhirsch A., Wood W., Coates A., Gelber R., Thürlimann B., Senn H.-J. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 // *Annals of Oncology.* – 2011. – V. 22, N 8. – P. 1736-1747.
128. Goldstein L. MDR-1 gene expression in solid tumours // *European Journal of Cancer.* – 1996. – V. 32, N 6. – P. 1039-1050.
129. Goler-Baron V., Sladkevich I., Assaraf Y.G. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway disrupts ABCG2-rich extracellular vesicles and overcomes multidrug resistance in breast cancer cells // *Biochemical pharmacology.* – 2012.
130. Goodarzi A.A., Block W.D., Lees-Miller S.P. The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control // *Prog Cell Cycle Res.* – 2003. – V. 5. – P. 393-411.
131. Gordon D.J., Resio B., Pellman D. Causes and consequences of aneuploidy in cancer // *Nature Reviews Genetics.* – 2012. – V. 13, N 3. – P. 189-203.
132. Gottesman M.M. Mechanisms of cancer drug resistance // *Annu Rev Med.* – 2002. – V. 53. – P. 615–627.
133. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters // *Nat Rev Cancer.* – 2002. – V. 2, N 1. – P. 48-58.
134. Gottesman M.M., Ling V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research // *FEBS letters.* – 2006. – V. 580, N 4. – P. 998-1009.
135. Gralow J.R., Burstein H.J., Wood W., Hortobagyi G.N., Gianni L., von Minckwitz G., Buzdar A.U., Smith I.E., Symmans W.F., Singh B., Winer E.P. Preoperative therapy in invasive breast cancer: pathologic assessment and systemic therapy issues in operable disease // *J Clin Oncol.* – 2008. – V. 26, N 5. – P. 814-819.

136. Greaves M., Maley C.C. Clonal evolution in cancer // *Nature*. – 2012. – V. 481, N 7381. – P. 306-313.
137. Greene B.T., Hughes A.D., King M.R. Circulating tumor cells: the substrate of personalized medicine? // *Front Oncol*. – 2012. – V. 2. – P. 69.
138. Gunnarsson R., Mansouri L., Isaksson A., Göransson H., Cahill N., Jansson M., Rasmussen M., Lundin J., Norin S., Buhl A.M. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia // *Haematologica*. – 2011. – V. 96, N 8. – P. 1161-1169.
139. Guo N., Faller D.V., Vaziri C. Carcinogen-induced S-phase arrest is Chk1 mediated and caffeine sensitive // *Cell Growth Differ*. – 2002. – V. 13, N 2. – P. 77-86.
140. Gutmann H., Hruz P., Zimmermann C., Beglinger C., Drewe J. Distribution of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) mRNA expression along the human GI tract // *Biochem Pharmacol*. – 2005. – V. 70, N 5. – P. 695-699.
141. Han S., Park K., Shin E., Kim H.-J., Kim J.Y., Kim J.Y., Gwak G. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer // *Oncology reports*. – 2010. – V. 24, N 1. – P. 121-128.
142. Hanafy S., Salem T., El-Aziz A., EL-Fiky B., Shokair M. Influence of anticancer drugs on DNA methylation in liver of female mice // *American Journal of Molecular Biology*. – 2011. – V. 1. – P. 62-69.
143. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell*. – 2011. – V. 144, N 5. – P. 646-674.
144. Harris L., Fritsche H., Mennel R., Norton L., Ravdin P., Taube S., Somerfield M.R., Hayes D.F., Bast Jr R.C. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer // *Journal of Clinical Oncology*. – 2007. – V. 25, N 33. – P. 5287-5312.
145. Hayward J., Carbone P., Heusen J., Kumaoka S., Segaloff A., Rubens R. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer // *British Journal of Cancer*. – 1977. – V. 35, N 3. – P. 292.
146. Hembruff S.L., Laberge M.L., Villeneuve D.J., Guo B., Veitch Z., Cecchetto M., Parissenti A.M. Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance // *BMC Cancer*. – 2008. – V. 8, N 1. – P. 318.
147. Henrichsen C.N., Chaignat E., Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression // *Human Molecular Genetics*. – 2009. – V. 18, N R1. – P. R1-R8.
148. Heppner G.H., Dexter D.L., DeNucci T., Miller F.R., Calabresi P. Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell subpopulations of a single mammary tumor // *Cancer Res*. – 1978. – V. 38, N 11 Pt 1. – P. 3758-63.
149. Hirayama H., Kimura Y., Kioka N., Matsuo M., Ueda K. ATPase activity of human ABCG1 is stimulated by cholesterol and sphingomyelin // *Journal of lipid research*. – 2013. – V. 54, N 2. – P. 496-502.
150. Hlavac V., Brynychová V., Václavíková R., Ehrlichová M., Vrána D., Pecha V., Kozevnikovova R., Trnková M., Gatek J., Kopperová D. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma // *Pharmacogenomics*. – 2013. – V. 14, N 5. – P. 515-529.
151. Ho C.C., Siu W.Y., Lau A., Chan W.M., Arooz T., Poon R.Y. Stalled replication induces p53 accumulation through distinct mechanisms from DNA damage checkpoint pathways // *Cancer Res*. – 2006. – V. 66, N 4. – P. 2233-2241.
152. Honorat M., Mesnier A., Vendrell J., Guitton J., Bieche I., Lidereau R., Kruh G.D., Dumontet C., Cohen P., Payen L. ABCC11 expression is regulated by estrogen in MCF7 cells, correlated with estrogen receptor α expression in postmenopausal breast tumors and overexpressed in tamoxifen-resistant breast cancer cells // *Endocrine-related cancer*. – 2008. – V. 15, N 1. – P. 125-138.

153. Horlings H.M., Lai C., Nuyten D.S., Halfwerk H., Kristel P., van Beers E., Joosse S.A., Klijn C., Nederlof P.M., Reinders M.J. Integration of DNA copy number alterations and prognostic gene expression signatures in breast cancer patients // *Clinical Cancer Research*. – 2010. – V. 16, N 2. – P. 651-663.
154. Hou J.M., Krebs M., Ward T., Sloane R., Priest L., Hughes A., Clack G., Ranson M., Blackhall F., Dive C. Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer // *Am J Pathol*. – 2011. – V. 178, N 3. – P. 989-96.
155. Hou J.M., Krebs M.G., Lancashire L., Sloane R., Backen A., Swain R.K., Priest L.J., Greystoke A., Zhou C., Morris K., Ward T., Blackhall F.H., Dive C. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer // *J Clin Oncol*. – 2012. – V. 30, N 5. – P. 525-32.
156. Hu H., Gatti R.A. MicroRNAs: new players in the DNA damage response // *J Mol Cell Biol*. – 2011. – V. 3, N 3. – P. 151-158.
157. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles // *Briefings in bioinformatics*. – 2012. – V. 13, N 3. – P. 305-316.
158. Huff L.M., Lee J.-S., Robey R.W., Fojo T. Characterization of gene rearrangements leading to activation of MDR-1 // *Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – V. 281, N 48. – P. 36501-36509.
159. Hugh J., Hanson J., Cheang M.C.U., Nielsen T.O., Perou C.M., Dumontet C., Reed J., Krajewska M., Treilleux I., Rupin M. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial // *Journal of Clinical Oncology*. – 2009. – V. 27, N 8. – P. 1168-1176.
160. Huh H.J., Park C.-J., Jang S., Seo E.-J., Chi H.-S., Lee J.-H., Lee K.-H., Seo J.J., Moon H.N., Ghim T. Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia // *Journal of Korean medical science*. – 2006. – V. 21, N 2. – P. 253-258.
161. Huls M., Brown C.D., Windass A.S., Sayer R., van den Heuvel J.J., Heemskerk S., Russel F.G., Masereeuw R. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane // *Kidney Int*. – 2008. – V. 73, N 2. – P. 220-5.
162. Hutson J.R., Koren G., Matthews S.G. Placental P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: influence of polymorphisms on fetal drug exposure and physiology // *Placenta*. – 2010. – V. 31, N 5. – P. 351-357.
163. Imyanitov E.N., Moiseyenko V.M. Molecular-based choice of cancer therapy: realities and expectations // *Clin Chim Acta*. – 2007. – V. 379, N 1-2. – P. 1-13.
164. Iorio M.V., Croce C.M. microRNA involvement in human cancer // *Carcinogenesis*. – 2012. – V. 33, N 6. – P. 1126-1133.
165. Iorio M.V., Croce C.M. microRNA involvement in human cancer // *Carcinogenesis*. – 2012.
166. Ivascu A., Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids // *Int J Oncol*. – 2007. – V. 31, N 6. – P. 1403-1413.
167. Ivascu A., Kubbies M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids // *International journal of oncology*. – 2007. – V. 31, N 6. – P. 1403-1414.
168. Izquierdo M.A., Scheffer G.L., Flens M.J., Giaccone G., Broxterman H.J., Meijer C., Van der Valk P., Scheper R.J. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors // *The American journal of pathology*. – 1996. – V. 148, N 3. – P. 877.
169. Jakobsson T., Venteclef N., Toresson G., Damdimopoulos A.E., Ehlund A., Lou X., Sanyal S., Steffensen K.R., Gustafsson J.-Å., Treuter E. GPS2 is required for cholesterol efflux by triggering histone demethylation, LXR recruitment, and coregulator assembly at the ABCG1 locus // *Molecular cell*. – 2009. – V. 34, N 4. – P. 510-518.

170. Jemal A., Siegel R., Xu J., Ward E. Cancer statistics, 2010 // *CA Cancer J Clin.* – 2010. – V. 60, N 5. – P. 277-300.
171. Jia X.Z., Yang S.Y., Zhou J., Li S.Y., Ni J.H., An G.S., Jia H.T. Inhibition of CHK1 kinase by Go6976 converts 8-chloro-adenosine-induced G2/M arrest into S arrest in human myelocytic leukemia K562 cells // *Biochem Pharmacol.* – 2009. – V. 77, N 5. – P. 770-80.
172. Jiang D.K., Ren W.H., Yao L., Wang W.Z., Peng B., Yu L. Meta-analysis of association between TP53 Arg72Pro polymorphism and bladder cancer risk // *Urology.* – 2010. – V. 76, N 3. – P. 765 e1-7.
173. Jiang D.K., Wang W.Z., Ren W.H., Yao L., Peng B., Yu L. TP53 Arg72Pro polymorphism and skin cancer risk: a meta-analysis // *J Invest Dermatol.* – 2011. – V. 131, N 1. – P. 220-8.
174. Jiang D.K., Yao L., Ren W.H., Wang W.Z., Peng B., Yu L. TP53 Arg72Pro polymorphism and endometrial cancer risk: a meta-analysis // *Med Oncol.* – 2010 V.29, N 4. – P. 1129-1135.
175. Jiang Z., Jones R., Liu J.C., Deng T., Robinson T., Chung P.E., Wang S., Herschkowitz J.I., Egan S.E., Perou C.M. RB1 and p53 at the crossroad of EMT and triple-negative breast cancer // *Cell Cycle.* – 2011. – V. 10, N 10. – P. 1563-1570.
176. Jin S., Scotto K.W. Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y // *Molecular and cellular biology.* – 1998. – V. 18, N 7. – P. 4377-4384.
177. Johnson R.A., Ince T.A., Scotto K.W. Transcriptional repression by p53 through direct binding to a novel DNA element // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276, N 29. – P. 27716-27720.
178. Jones P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond // *Nature Reviews Genetics.* – 2012. – V. 13, N 7. – P. 484-492.
179. Jönsson G., Staaf J., Vallon-Christersson J., Ringnér M., Holm K., Hegardt C., Gunnarsson H., Fagerholm R., Strand C., Agnarsson B.A. Research article Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics // – 2010. 12:R42
180. Juliano R.L., Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.* – 1976. – V. 455, N 1. – P. 152-162.
181. Kampinga H.H. Hyperthermia, thermotolerance and topoisomerase II inhibitors // *Br J Cancer.* – 1995. – V. 72, N 2. – P. 333-338.
182. Kantharidis P., El-Osta A., Wall D., Hu X., Slater A., Nadalin G., Parkin J., Zalcborg J. Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance // *Clinical Cancer Research.* – 1997. – V. 3, N 11. – P. 2025-2032.
183. Kanzaki A., Toi M., Nakayama K., Bando H., Mutoh M., Uchida T., Fukumoto M., Takebayashi Y. Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma // *Jpn J Cancer Res.* – 2001. – V. 92, N 4. – P. 452-458.
184. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations // *Journal of the American statistical association.* – 1958. – V. 53, N 282. – P. 457-481.
185. Katoh H., Shibata T., Kokubu A., Ojima H., Loukopoulos P., Kanai Y., Kosuge T., Fukayama M., Kondo T., Sakamoto M. Genetic profile of hepatocellular carcinoma revealed by array-based comparative genomic hybridization: identification of genetic indicators to predict patient outcome // *Journal of hepatology.* – 2005. – V. 43, N 5. – P. 863-874.
186. Kats-Ugurlu G., Roodink I., de Weijert M., Tiemessen D., Maass C., Verrijp K., van der Laak J., de Waal R., Mulders P., Oosterwijk E., Leenders W. Circulating tumour tissue fragments in patients with pulmonary metastasis of clear cell renal cell carcinoma // *J Pathol.* – 2009. – V. 219, N 3. – P. 287-293.
187. Kaufmann M., Hortobagyi G.N., Goldhirsch A., Scholl S., Makris A., Valagussa P., Blohmer J.U., Eiermann W., Jackesz R., Jonat W. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update // *Journal of Clinical Oncology.* – 2006. – V. 24, N 12. – P. 1940-1949.

188. Kaufmann M., Hortobagyi G.N., Goldhirsch A., Scholl S., Makris A., Valagussa P., Blohmer J.U., Eiermann W., Jackesz R., Jonat W., Lebeau A., Loibl S., Miller W., Seeber S., Semiglazov V., Smith R., Souchon R., Stearns V., Untch M., von Minckwitz G. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: an update // *J Clin Oncol.* – 2006. – V. 24, N 12. – P. 1940-1949.
189. Kaufmann M., von Minckwitz G., Bear H.D., Buzdar A., McGale P., Bonnefoi H., Colleoni M., Denkert C., Eiermann W., Jackesz R., Makris A., Miller W., Pierga J.Y., Semiglazov V., Schneeweiss A., Souchon R., Stearns V., Untch M., Loibl S. Recommendations from an international expert panel on the use of neoadjuvant (primary) systemic treatment of operable breast cancer: new perspectives 2006 // *Ann Oncol.* – 2007. – V. 18, N 12. – P. 1927-1934.
190. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carey L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R., Karn T., Liedtke C., Mauri D., Rouzier R., Ruckhaeberle E., Semiglazov V., Symmans W.F., Tutt A., Pusztai L. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer // *Ann Surg Oncol.* – 2012. – V. 19, N 5. – P. 1508-1516.
191. Kaufmann M., von Minckwitz G., Smith R., Valero V., Gianni L., Eiermann W., Howell A., Costa S.D., Beuzeboc P., Untch M., Blohmer J.U., Sinn H.P., Sittek R., Souchon R., Tulusan A.H., Volm T., Senn H.J. International expert panel on the use of primary (preoperative) systemic treatment of operable breast cancer: review and recommendations // *J Clin Oncol.* – 2003. – V. 21, N 13. – P. 2600-2608.
192. Keats J.J., Chesi M., Egan J.B., Garbitt V.M., Palmer S.E., Braggio E., Van Wier S., Blackburn P.R., Baker A.S., Dispenzieri A., Kumar S., Rajkumar S.V., Carpten J.D., Barrett M., Fonseca R., Stewart A.K., Bergsagel P.L. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma // *Blood.* – 2012. – V. 120, N 5. – P. 1067-1076.
193. Kerr I.D., Haider A.J., Gelissen I.C. The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty // *British journal of pharmacology.* – 2011. – V. 164, N 7. – P. 1767-1779.
194. Keskin S., Muslumanoglu M., Saip P., Karanlik H., Guveli M., Pehlivan E., Aydogan F., Eralp Y., Aydiner A., Yavuz E., Ozmen V., Igci A., Topuz E. Clinical and pathological features of breast cancer associated with the pathological complete response to anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy // *Oncology.* – 2011. – V. 81, N 1. – P. 30-38.
195. Kickhoefer V.A., Rajavel K.S., Scheffer G.L., Dalton W.S., Scheper R.J., Rome L.H. Vaults are up-regulated in multidrug-resistant cancer cell lines // *Journal of Biological Chemistry.* – 1998. – V. 273, N 15. – P. 8971-8974.
196. Kickhoefer V.A., Stephen A.G., Harrington L., Robinson M.O., Rome L.H. Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1 // *Journal of Biological Chemistry.* – 1999. – V. 274, N 46. – P. 32712-32717.
197. Kim B., Fatayer H., Hanby A.M., Horgan K., Perry S.L., Valleley E.M., Verghese E.T., Williams B.J., Thorne J.L., Hughes T.A. Neoadjuvant Chemotherapy Induces Expression Levels of Breast Cancer Resistance Protein That Predict Disease-Free Survival in Breast Cancer // *PLoS ONE.* – 2013. – V. 8, N 5. – P. e62766.
198. Kitazono M., Okumura H., Ikeda R., Sumizawa T., Furukawa T., Nagayama S., Seto K., Aikou T., Akiyama S.i. Reversal of LRP-associated drug resistance in colon carcinoma sw-620 cells // *International Journal of Cancer.* – 2001. – V. 91, N 1. – P. 126-131.
199. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1971. – V. 68, N 4. – P. 820-823.
200. Kobayashi H., Man S., Graham C.H., Kapitan S.J., Teicher B.A., Kerbel R.S. Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1993. – V. 90, N 8. – P. 3294-3298.

201. Kokko R., Holli K., Hakama M. Ca 15-3 in the follow-up of localised breast cancer: a prospective study // *European Journal of Cancer*. – 2002. – V. 38, N 9. – P. 1189-1193.
202. Komaki K., Sano N., Tangoku A. Problems in histological grading of malignancy and its clinical significance in patients with operable breast cancer // *Breast Cancer*. – 2006. – V. 13, N 3. – P. 249-253.
203. Kool M., de Haas M., Scheffer G.L., Scheper R.J., van Eijk M.J.T., Juijn J.A., Baas F., Borst P. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines // *Cancer Research*. – 1997. – V. 57, N 16. – P. 3537-3547.
204. Korthagen N., van Moorsel C., Kazemier K., Grutters J. Association between polymorphisms in the P53 and P21 genes and IPF // *European Respiratory Journal*. – 2011. – V. 38, N Suppl 55. – P. 1995.
205. Korthagen N.M., van Moorsel C.H., Barlo N.P., Kazemier K.M., Ruven H.J., Grutters J.C. Association between variations in cell cycle genes and idiopathic pulmonary fibrosis // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7, N 1. – P. e30442.
206. Kouidou S., Agidou T., Kyrkou A., Andreou A., Katopodi T., Georgiou E., Krikelis D., Dimitriadou A., Spanos P., Tsilikas C., Destouni H., Tzimagiorgis G. Non-CpG cytosine methylation of p53 exon 5 in non-small cell lung carcinoma // *Lung Cancer*. – 2005. – V. 50, N 3. – P. 299-307.
207. Kouidou S., Malousi A., Maglaveras N. Methylation and repeats in silent and nonsense mutations of p53 // *Mutat Res*. – 2006. – V. 599, N 1-2. – P. 167-77.
208. Kozlova N.I., Morozevich G.E., Shtil A.A., Berman A.E. Multidrug-resistant tumor cells with decreased malignancy: a role for integrin $\alpha\beta 3$ // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2004. – V. 316, N 4. – P. 1173-1177.
209. Kuerer H.M., Newman L.A., Buzdar A.U., Hunt K.K., Dhingra K., Buchholz T.A., Binkley S.M., Ames F.C., Feig B.W., Ross M.I., Hortobagyi G.N., Singletary S.E. Residual metastatic axillary lymph nodes following neoadjuvant chemotherapy predict disease-free survival in patients with locally advanced breast cancer // *Am J Surg*. – 1998. – V. 176, N 6. – P. 502-509.
210. Kuerer H.M., Newman L.A., Smith T.L., Ames F.C., Hunt K.K., Dhingra K., Theriault R.L., Singh G., Binkley S.M., Sneige N., Buchholz T.A., Ross M.I., McNeese M.D., Buzdar A.U., Hortobagyi G.N., Singletary S.E. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy // *J Clin Oncol*. – 1999. – V. 17, N 2. – P. 460-469.
211. Kuo M.T. Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance // *Adv Exp Med Biol*. – 2007. – V. 608. – P. 23-30.
212. Kusaba H., Nakayama M., Harada T., Nomoto M., Kohno K., Kuwano M., Wada M. Association of 5' CpG demethylation and altered chromatin structure in the promoter region with transcriptional activation of the multidrug resistance 1 gene in human cancer cells // *Eur J Biochem*. – 1999. – V. 262, N 3. – P. 924-932.
213. Laakso M., Tanner M., Nilsson J., Wiklund T., Erikstein B., Kellokumpu-Lehtinen P., Malmström P., Wilking N., Bergh J., Isola J. Basolateral carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer // *Clinical Cancer Research*. – 2006. – V. 12, N 14. – P. 4185-4191.
214. Lacave R., Coulet F., Ricci S., Touboul E., Flahault A., Rateau J.G., Cesari D., Lefranc J.P., Bernaudin J.F. Comparative evaluation by semiquantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of MDR1, MRP and GSTp gene expression in breast carcinomas // *Br J Cancer*. – 1998. – V. 77, N 5. – P. 694-702.
215. Laird P.W. Cancer epigenetics // *Hum Mol Genet*. – 2005. – V. 14 Spec No 1. – P. R65-76.
216. Langerød A., Bukholm I.R., Bregård A., Lønning P.E., Andersen T.I., Rognum T.O., Meling G.I., Lothe R.A., Børresen-Dale A.-L. The TP53 codon 72 polymorphism may affect the

- function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. – 2002. – V. 11, N 12. – P. 1684-1688.
217. Langerod A., Zhao H., Borgan O., Nesland J.M., Bukholm I.R., Ikdahl T., Karesen R., Borresen-Dale A.-L., Jeffrey S.S. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer // *Breast Cancer Res*. – 2007. – V. 9, N 3. – P. R30.
218. Larkin A., O'Driscoll L., Kennedy S., Purcell R., Moran E., Crown J., Parkinson M., Clynes M. Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study // *Int J Cancer*. – 2004. – V. 112, N 2. – P. 286-294.
219. Learn P.A., Yeh I.T., McNutt M., Chisholm G.B., Pollock B.H., Rousseau D.L., Jr., Sharkey F.E., Cruz A.B., Kahlenberg M.S. HER-2/neu expression as a predictor of response to neoadjuvant docetaxel in patients with operable breast carcinoma // *Cancer*. – 2005. – V. 103, N 11. – P. 2252-2260.
220. Lee J., Im Y.H., Lee S.H., Cho E.Y., Choi Y.L., Ko Y.H., Kim J.H., Nam S.J., Kim H.J., Ahn J.S., Park Y.S., Lim H.Y., Han B.K., Yang J.H. Evaluation of ER and Ki-67 proliferation index as prognostic factors for survival following neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin/docetaxel for locally advanced breast cancer // *Cancer Chemother Pharmacol*. – 2008. – V. 61, N 4. – P. 569-577.
221. Lee S., Choi E.-J., Jin C., Kim D.-H. Activation of PI3K/Akt pathway by PTEN reduction and PIK3CA mRNA amplification contributes to cisplatin resistance in an ovarian cancer cell line // *Gynecologic oncology*. – 2005. – V. 97, N 1. – P. 26-34.
222. Leonard G.D., Fojo T., Bates S.E. The role of ABC transporters in clinical practice // *The Oncologist*. – 2003. – V. 8, N 5. – P. 411-424.
223. Leonessa F., Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer // *Endocr Relat Cancer*. – 2003. – V. 10, N 1. – P. 43-73.
224. Leung A.K., Sharp P.A. MicroRNA functions in stress responses // *Molecular cell*. – 2010. – V. 40, N 2. – P. 205-215.
225. Li1, W., Liu2, C., Tang Y., Li H., Zhou F., Lv S. Overexpression of Snail Accelerates Adriamycin Induction of Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2011. – V. 12. – P. 2575-2580.
226. Liang Z., Wu H., Xia J., Li Y., Zhang Y., Huang K., Wagar N., Yoon Y., Cho H.T., Scala S. Involvement of miR-326 in chemotherapy resistance of breast cancer through modulating expression of multidrug resistance-associated protein 1 // *Biochemical pharmacology*. – 2010. – V. 79, N 6. – P. 817-824.
227. Lin H.-Y., Yang M.-C., Huang C.-H., Wu W.-J., Yu T.-J., Lung F.-W. Polymorphisms of TP53 are markers of bladder cancer vulnerability and prognosis // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. – T. 31 –Elsevier, 2013. – C. 1231-1241.
228. Lin Y., Khokhlatchev A., Figeys D., Avruch J. Death-associated protein 4 binds MST1 and augments MST1-induced apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – V. 277, N 50. – P. 47991-48001.
229. Linn S.C., Pinedo H.M., van Ark-Otte J., van der Valk P., Hoekman K., Honkoop A.H., Vermorken J.B., Giaccone G. Expression of drug resistance proteins in breast cancer, in relation to chemotherapy // *Int J Cancer*. – 1997. – V. 71, N 5. – P. 787-795.
230. List A.F. Role of multidrug resistance and its pharmacological modulation in acute myeloid leukemia // *Leukemia*. – 1996. – V. 10, N 6. – P. 937-942.
231. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M., Denisov E.V., Garbukov E.Y., Merzliakova M.K., Volkomorov V.V., Vtorushin S.V., Zavyalova M.V., Slonimskaya E.M., Perelmuter V.M. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response // *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. – 2013. – V. 71, N 1. – P. 153-163.
232. Litviakov N.V., Denisov E.V., Takhauov R.M., Karpov A.B., Skobel'skaja E.V., Vasil'eva E.O., Goncharik O.O., Ageeva A.M., Mamonova N.V., Mezheritskiy S.A. Association between

- TP53 gene ARG72PRO polymorphism and chromosome aberrations in human cancers // *Molecular Carcinogenesis*. – 2010. – V. 49, N 6. – P. 521-524.
233. Litviakov N.V., Garbukov E.Y., Slonimskaya E.M., Tsyganov M.M., Denisov E.V., Vtorushin S.V., Christenko K.Y., Zavyalova M.V., Cherdyntseva N.V. Connection of Metastasis-Free Survival in Breast Cancer Patients and an Expression vector of Multidrug Resistance Genes in Tumor During Neoadjuvant Chemotherapy // *Voprosy Onkologii (St. Petersburg)*. – 2013. – V. 59, N 3. – P. 334-340.
234. Loch S., Tampe R. Viral evasion of the MHC class I antigen-processing machinery // *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. – 2005. – V. 451, N 3. – P. 409-417.
235. Lockhart A.C., Tirona R.G., Kim R.B. Pharmacogenetics of ATP-binding Cassette Transporters in Cancer and Chemotherapy // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2003. – V. 2, N 7. – P. 685-698.
236. Loe D.W., Deeley R., Cole S. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP // *European Journal of Cancer*. – 1996. – V. 32, N 6. – P. 945-957.
237. Lønning P. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? // *Annals of Oncology*. – 2007. – V. 18, N suppl 8. – P. viii3-viii7.
238. Ma J., Dong C., Ji C. MicroRNA and drug resistance // *Cancer gene therapy*. – 2010. – V. 17, N 8. – P. 523-531.
239. Maciejczyk A., Jagoda E., Wysocka T., Matkowski R., Györfy B., Lage H., Surowiak P. ABCC2 (MRP2, cMOAT) Localized in the nuclear envelope of breast carcinoma cells correlates with poor clinical outcome // *Pathology & Oncology Research*. – 2012. – P. 1-12.
240. Maliepaard M., Scheffer G.L., Faneyte I.F., van Gastelen M.A., Pijnenborg A.C., Schinkel A.H., van De Vijver M.J., Scheper R.J., Schellens J.H. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues // *Cancer Res*. – 2001. – V. 61, N 8. – P. 3458-3464.
241. Marusyk A., Almendro V., Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – V. 12, N 5. – P. 323-334.
242. Matsuo K., Eno M.L., Ahn E.H., Shahzad M.M., Im D.D., Rosenshein N.B., Sood A.K. Multidrug resistance gene (MDR-1) and risk of brain metastasis in epithelial ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer // *Am J Clin Oncol*. – 2011. – V. 34, N 5. – P. 488-493.
243. Matsuo M. ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2009. – V. 74, N 5. – P. 899-907.
244. Mauriac L., Durand M., Avril A., Dilhuydy J.M. Effects of primary chemotherapy in conservative treatment of breast cancer patients with operable tumors larger than 3 cm. Results of a randomized trial in a single centre // *Ann Oncol*. – 1991. – V. 2, N 5. – P. 347-354.
245. McAleer M.A., Breen M.A., White N.L., Matthews N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – V. 274, N 33. – P. 23541-23548.
246. McClelland S.E., Burrell R.A., Swanton C. Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy // *Cell Cycle*. – 2009. – V. 8, N 20. – P. 3262-3266.
247. McGranahan N., Burrell R.A., Endesfelder D., Novelli M.R., Swanton C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges // *EMBO reports*. – 2012. – V. 13, N 6. – P. 528-538.
248. Michor F., Polyak K. The origins and implications of intratumor heterogeneity // *Cancer Prev Res (Phila)*. – 2010. – V. 3, N 11. – P. 1361-1364.
249. Moiseyenko V.M., Protsenko S.A., Brezhnev N.V., Maximov S.Y., Gershveld E.D., Hudyakova M.A., Lobeiko O.S., Gergova M.M., Krzhivitskiy P.I., Semionov I.I. High sensitivity of BRCA1-associated tumors to cisplatin monotherapy: report of two cases // *Cancer genetics and cytogenetics*. – 2010. – V. 197, N 1. – P. 91-94.

250. Moitra K. ABC Transporters in Human Disease // Colloquium Series on The Genetic Basis of Human Disease. – T. 1 –Morgan & Claypool Life Sciences, 2012. – C. 1-84.
251. Molnar B., Ladanyi A., Tanko L., Sreter L., Tulassay Z. Circulating tumor cell clusters in the peripheral blood of colorectal cancer patients // *Clin Cancer Res.* – 2001. – V. 7, N 12. – P. 4080-4085.
252. Moore N., Lyle S. Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance // *J Oncol.* – 2011. – doi:10.1155/2011/396076
253. Morozevich G., Kozlova N., Cheglakov I., Ushakova N., Berman A. Integrin $\alpha 5\beta 1$ controls invasion of human breast carcinoma cells by direct and indirect modulation of MMP-2 collagenase activity // *Cell Cycle.* – 2009. – V. 8, N 14. – P. 2219-2225.
254. Morozevich G., Kozlova N., Ushakova N., Preobrazhenskaya M., Berman A. Involvement of integrin $\alpha 5\beta 1$ in apoptosis and drug resistance of human breast carcinoma cells // *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry.* – 2011. – V. 5, N 3. – P. 241-245.
255. Mossink M.H., van Zon A., Scheper R.J., Sonneveld P., Wiemer E.A. Vaults: a ribonucleoprotein particle involved in drug resistance? // *Oncogene.* – 2003. – V. 22, N 47. – P. 7458-67.
256. Moureau-Zabotto L., Ricci S., Lefranc J.P., Coulet F., Genestie C., Antoine M., Uzan S., Lotz J.P., Touboul E., Lacave R. Prognostic impact of multidrug resistance gene expression on the management of breast cancer in the context of adjuvant therapy based on a series of 171 patients // *Br J Cancer.* – 2006. – V. 94, N 4. – P. 473-80.
257. Muggerud A.A., Ronneberg J.A., Warnberg F., Botling J., Busato F., Jovanovic J., Solvang H., Bukholm I., Borresen-Dale A.L., Kristensen V.N., Sorlie T., Tost J. Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2010. – V. 12, N 1. – P. R3.
258. Mullighan C.G., Goorha S., Radtke I., Miller C.B., Coustan-Smith E., Dalton J.D., Girtman K., Mathew S., Ma J., Pounds S.B. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia // *Nature.* – 2007. – V. 446, N 7137. – P. 758-764.
259. Mullighan C.G., Phillips L.A., Su X., Ma J., Miller C.B., Shurtleff S.A., Downing J.R. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia // *Science.* – 2008. – V. 322, N 5906. – P. 1377-80.
260. Munoz M., Henderson M., Haber M., Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer // *IUBMB Life.* – 2007. – V. 59, N 12. – P. 752-757.
261. Murray N.P., Vidal Albarran R.-C., Pérez O G., Ruiz M A., Porcell E J., Castillo A A.M. Cytomorphology of Circulating Tumor Cells and Cell Clusters in Chilean Patients with Colorectal Cancer // *International Journal of Morphology.* – 2012. – V. 30. – P. 834-839.
262. Nakanishi T., Ross D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression // *Chin J Cancer.* – 2012. – V. 31, N 2. – P. 73-99.
263. Nassar A., Radhakrishnan A., Cabrero I.A., Cotsonis G.A., Cohen C. Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.* – 2010. – V. 18, N 5. – P. 433.
264. Navin N., Kendall J., Troge J., Andrews P., Rodgers L., McIndoo J., Cook K., Stepansky A., Levy D., Esposito D. Tumour evolution inferred by single-cell sequencing // *Nature.* – 2011. – V. 472, N 7341. – P. 90-94.
265. Navin N., Krasnitz A., Rodgers L., Cook K., Meth J., Kendall J., Riggs M., Eberling Y., Troge J., Grubor V., Levy D., Lundin P., Maner S., Zetterberg A., Hicks J., Wigler M. Inferring tumor progression from genomic heterogeneity // *Genome Res.* – 2010. – V. 20, N 1. – P. 68-80.
266. Neganova I., Vilella F., Atkinson S.P., Lloret M., Passos J.F., von Zglinicki T., O'Connor J.E., Burks D., Jones R., Armstrong L., Lako M. An Important Role for CDK2 in G1 to S

- Checkpoint Activation and DNA Damage Response in Human Embryonic Stem Cells // *Stem Cells*. – 2011.
267. Ng C.K., Pemberton H.N., Reis-Filho J.S. Breast cancer intratumor genetic heterogeneity: causes and implications // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2012. – V. 12, N 8. – P. 1021-32.
268. Nicolini A., Tartarelli G., Carpi A., Metelli M.R., Ferrari P., Anselmi L., Conte M., Berti P., Miccoli P. Intensive post-operative follow-up of breast cancer patients with tumour markers: CEA, TPA or CA15. 3 vs MCA and MCA-CA15. 3 vs CEA-TPA-CA15. 3 panel in the early detection of distant metastases // *BMC Cancer*. – 2006. – V. 6, N 1. – P. 269.
269. Nies A., Jedlitschky G., König J., Herold-Mende C., Steiner H., Schmitt H.-P., Keppler D. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1–MRP6 (ABCC1–ABCC6), in human brain // *Neuroscience*. – 2004. – V. 129, N 2. – P. 349-360.
270. Nigro J.M., Baker S.J., Preisinger A.C., Jessup J.M., Hosteller R., Cleary K., Signer S.H., Davidson N., Baylin S., Devilee P. Mutations in the p 53 gene occur in diverse human tumour types // *Nature*. – 1989. – V. 342, N 6250. – P. 705-708.
271. Nishimura M., Yoshitsugu H., Naito S., Hiraoka I. Evaluation of gene induction of drug-metabolizing enzymes and transporters in primary culture of human hepatocytes using high-sensitivity real-time reverse transcription PCR // *Yakugaku Zasshi*. – 2002. – V. 122, N 5. – P. 339-361.
272. Nooter K., de la Riviere G.B., Look M., Van Wingerden K., Henzen-Logmans S., Scheper R., Flens M., Klijn J., Stoter G., Foekens J. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer // *British Journal of Cancer*. – 1997. – V. 76, N 4. – P. 486-493.
273. O'Driscoll L., Clynes M. Molecular markers of multiple drug resistance in breast cancer // *Chemotherapy*. – 2006. – V. 52, N 3. – P. 125-129.
274. *Breast Pathology* /O'Malley F.P., Pinder S.E., Mulligan A.M. – 2nd изд. – Philadelphia, PA: Elsevier, 2011.
275. Ogretmen B., Safa A.R. Negative Regulation of MDR 1 Promoter Activity in MCF-7, but Not in Multidrug Resistant MCF-7/Adr, Cells by Cross-Coupled NF- κ B/p65 and c-Fos Transcription Factors and Their Interaction with the CAAT Region // *Biochemistry*. – 1999. – V. 38, N 7. – P. 2189-2199.
276. Oguri T., Isobe T., Suzuki T., Nishio K., Fujiwara Y., Katoh O., Yamakido M. Increased expression of the MRP5 gene is associated with exposure to platinum drugs in lung cancer // *International Journal of Cancer*. – 2000. – V. 86, N 1. – P. 95-100.
277. Olive P.L., Durand R.E. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics // *Cancer Metastasis Rev.* – 1994. – V. 13, N 2. – P. 121-138.
278. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. – 2010. – V. 2, N 1. - a001008
279. Ow T.J., Sandulache V.C., Skinner H.D., Myers J.N. Integration of cancer genomics with treatment selection // *Cancer*. – 2013 V. 119, N 22.- P. 3814-3928.
280. Pajic M., Iyer J.K., Kersbergen A., van der Burg E., Nygren A.O., Jonkers J., Borst P., Rottenberg S. Moderate increase in Mdr1a/1b expression causes in vivo resistance to doxorubicin in a mouse model for hereditary breast cancer // *Cancer Research*. – 2009. – V. 69, N 16. – P. 6396-6404.
281. Pan Y.-Z., Morris M.E., Yu A.-M. MicroRNA-328 negatively regulates the expression of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in human cancer cells // *Molecular pharmacology*. – 2009. – V. 75, N 6. – P. 1374-1379.
282. Pang E., Hu Y., Chan K.Y., Lai P.B., Squire J.A., Macgregor P.F., Beheshti B., Albert M., Leung T.W., Wong N. Karyotypic imbalances and differential gene expressions in the acquired doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma cells // *Laboratory Investigation*. – 2005. – V. 85, N 5. – P. 664-674.

283. Park S., Shimizu C., Shimoyama T., Takeda M., Ando M., Kohno T., Katsumata N., Kang Y.K., Nishio K., Fujiwara Y. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients // *Breast Cancer Res Treat.* – 2006. – V. 99, N 1. – P. 9-17.
284. Park S.Y., Gonen M., Kim H.J., Michor F., Polyak K. Cellular and genetic diversity in the progression of in situ human breast carcinomas to an invasive phenotype // *J Clin Invest.* – 2010. – V. 120, N 2. – P. 636-644.
285. Parker J.S., Mullins M., Cheang M.C.U., Leung S., Voduc D., Vickery T., Davies S., Fauron C., He X., Hu Z. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes // *Journal of Clinical Oncology.* – 2009. – V. 27, N 8. – P. 1160-1167.
286. Patani N., Barbashina V., Lambros M.B., Gauthier A., Mansour M., Mackay A., Reis-Filho J.S. Direct evidence for concurrent morphological and genetic heterogeneity in an invasive ductal carcinoma of triple-negative phenotype // *J Clin Pathol.* – 2011. – V. 64, N 9. – P. 822-828.
287. Paulusma C.C., Bosma P.J., Zaman G.J., Bakker C.T., Otter M., Scheffer G.L., Scheper R.J., Borst P., Elferink R.P.O. Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene // *Science.* – 1996. – V. 271, N 5252. – P. 1126-1128.
288. Pereira H., Pinder S., Sibbering D., Galea M., Elston C., Blamey R., Robertson J., Ellis I. Pathological prognostic factors in breast cancer. IV: Should you be a typer or a grader? A comparative study of two histological prognostic features in operable breast carcinoma // *Histopathology.* – 2007. – V. 27, N 3. – P. 219-226.
289. Perel'muter V.M., Zav'ialova M.V., Vtorushin S.V., Slonimskaja E.M., Kritskaia N.G., Garbukov E., Litviakov N.V., Stakheeva M.N., Babyshkina N.N., Malinovskaia E.A., Denisov E.V., Grigor'eva E.S., Nazarenko M.S., Sennikov S.V., Goreva E.P., Kozlov V.A., Voevoda M.I., Maksimov V.N., Beliavskaia V.A., Cherdyntseva N.V. Genetic and clinical and pathological characteristics of breast cancer in premenopausal and postmenopausal women // *Adv Gerontol.* – 2008. – V. 21, N 4. – P. 643-653.
290. Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A. Molecular portraits of human breast tumours // *Nature.* – 2000. – V. 406, N 6797. – P. 747-752.
291. Petitjean A., Achatz M., Borresen-Dale A., Hainaut P., Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes // *Oncogene.* – 2007. – V. 26, N 15. – P. 2157-2165.
292. Petrenko A., Eshilev E., Kisseljova N. Identification of CpG islands hypermethylated in tumor and transformed cells by the methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction // *Molecular Biology.* – 2000. – V. 34, N 3. – P. 408-412.
293. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29, N 9. – P. e45.
294. Phipps A.I., Li C.I., Kerlikowske K., Barlow W.E., Buist D.S.M. Risk factors for ductal, lobular, and mixed ductal-lobular breast cancer in a screening population // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* – 2010. – V. 19, N 6. – P. 1643-1654.
295. Pierga J.Y., Mouret E., Laurence V., Dieras V., Savignoni A., Beuzeboc P., Dorval T., Palangie T., Jouve M., Pouillart P. Prognostic factors for survival after neoadjuvant chemotherapy in operable breast cancer. the role of clinical response // *Eur J Cancer.* – 2003. – V. 39, N 8. – P. 1089-1096.
296. Polgar O., Ozvegy-Laczka C., Robey R.W., Morisaki K., Okada M., Tamaki A., Koblos G., Elkind N.B., Ward Y., Dean M. Mutational studies of G553 in TM5 of ABCG2: a residue potentially involved in dimerization // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45, N 16. – P. 5251-5260.
297. Potts S.J., Krueger J.S., Landis N.D., Eberhard D.A., Young G.D., Schmechel S.C., Lange H. Evaluating tumor heterogeneity in immunohistochemistry-stained breast cancer tissue // *Lab Invest.* – 2012. – V. 92, N 9. – P. 1342-1357.

298. Pratt S., Shepard R.L., Kandasamy R.A., Johnston P.A., Perry W., 3rd, Dantzig A.H. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites // *Mol Cancer Ther.* – 2005. – V. 4, N 5. – P. 855-863.
299. Precht L.M., Lowe K.A., Atwood M., Beatty J.D. Neoadjuvant chemotherapy of breast cancer: tumor markers as predictors of pathologic response, recurrence, and survival // *Breast J.* – 2010. – V. 16, N 4. – P. 362-368.
300. Raffi A., Mirshahi P., Simon A., Faussat A., Ducros E., Marie J., Pujade Lauraone E., Soria J., Mirshahi M. Stromal cells extracted from ovarian cancer express functional multi drugs resistance proteins: ATP binding cassette and Major vault protein. // *Journal of Clinical Oncology*, 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I. 2006.- Vol 24, No. 18S (June 20 Supplement).
301. Raghu G., Park S.W., Roninson I.B., Mechetner E.B. Monoclonal antibodies against P-glycoprotein, an MDR1 gene product, inhibit interleukin-2 release from PHA-activated lymphocytes // *Exp Hematol.* – 1996. – V. 24, N 10. – P. 1258-1264.
302. Raguz S., Randle R.A., Sharpe E.R., Foekens J.A., Sieuwerts A.M., Meijer-van Gelder M.E., Melo J.V., Higgins C.F., Yagüe E. Production of P-glycoprotein from the MDR1 upstream promoter is insufficient to affect the response to first-line chemotherapy in advanced breast cancer // *International Journal of Cancer.* – 2008. – V. 122, N 5. – P. 1058-1067.
303. Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Baehner F., Dabbs D.J., Decker T., Eusebi V., Fox S.B., Ichihara S., Jacquemier J., Lakhani S.R. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade // *Breast Cancer Res.* – 2010. – V. 12, N 4. – P. 207-219.
304. Rao V.V., Dahlheimer J.L., Bardgett M.E., Snyder A.Z., Finch R.A., Sartorelli A.C., Piwnicka-Worms D. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 1999. – V. 96, N 7. – P. 3900-3905.
305. Raychaudhuri M., Schuster T., Buchner T., Malinowsky K., Bronger H., Schwarz-Boeger U., Hofler H., Avril S. Intratumoral heterogeneity of microRNA expression in breast cancer // *J Mol Diagn.* – 2012. – V. 14, N 4. – P. 376-384.
306. Reed K., Parissenti A.M. Epigenetic Regulation of ABCB1 Transporter Expression and Function // *Current Pharmacog* –2010. – V. 8, N 3. – P. 218-231.
307. Rizzato C., Scherer D., Rudnai P., Gurzau E., Koppova K., Hemminki K., Canzian F., Kumar R., Campa D. POMC and TP53 genetic variability and risk of basal cell carcinoma of skin: Interaction between host and genetic factors // *Journal of dermatological science.* – 2011. – V. 63, N 1. – P. 47-54.
308. Robey R.W., Polgar O., Deeken J., To K.W., Bates S.E. ABCG2: determining its relevance in clinical drug resistance // *Cancer and Metastasis Reviews.* – 2007. – V. 26, N 1. – P. 39-57.
309. Rocchi E., Khodjakov A., Volk E.L., Yang C.-H., Litman T., Bates S.E., Schneider E. The Product of the ABC Half-Transporter Gene *ABCG2* (BCRP/MXR/ABCP) Is Expressed in the Plasma Membrane // *Biochemical and biophysical research communications.* – 2000. – V. 271, N 1. – P. 42-46.
310. Rosen's breast pathology. / Rosen P.P.: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
311. Rouzier R., Extra J.M., Klijanienko J., Falcou M.C., Asselain B., Vincent-Salomon A., Vielh P., Bourstyn E. Incidence and prognostic significance of complete axillary downstaging after primary chemotherapy in breast cancer patients with T1 to T3 tumors and cytologically proven axillary metastatic lymph nodes // *J Clin Oncol.* – 2002. – V. 20, N 5. – P. 1304-1310.
312. Rouzier R., Perou C.M., Symmans W.F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., Hess K.R., Stec J., Ayers M., Wagner P. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy // *Clinical Cancer Research.* – 2005. – V. 11, N 16. – P. 5678-5685.
313. Rudas M., Filipits M., Taucher S., Stranzl T., Steger G.G., Jakesz R., Pirker R., Pohl G. Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy // *Breast Cancer Research and Treatment.* – 2003. – V. 81, N 2. – P. 149-157.

314. Rybarova S., Hodorova I., Hajdukova M., Schmidtova K., Mojzis J., Kajo K., Kviatkovska Z., Plank L., Benický M., Mirossay A. Expression of MDR proteins in breast cancer and its correlation with some clinical and pathological parameters // *Neoplasma*. – 2005. – V. 53, N 2. – P. 128-135.
315. Saito S., Goodarzi A.A., Higashimoto Y., Noda Y., Lees-Miller S.P., Appella E., Anderson C.W. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation // *J Biol Chem*. – 2002. – V. 277, N 15. – P. 12491-12494.
316. Samlowski W.E., Leachman S.A., Wade M., Cassidy P., Porter-Gill P., Busby L., Wheeler R., Boucher K., Fitzpatrick F., Jones D.A., Karpf A.R. Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation // *J Clin Oncol*. – 2005. – V. 23, N 17. – P. 3897-3905.
317. Sampath J., Sun D., Kidd V.J., Grenet J., Gandhi A., Shapiro L.H., Wang Q., Zambetti G.P., Schuetz J.D. Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1 // *J Biol Chem*. – 2001. – V. 276, N 42. – P. 39359-393567.
318. Saunders N.A., Simpson F., Thompson E.W., Hill M.M., Endo-Munoz L., Leggatt G., Minchin R.F., Guminski A. Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives // *EMBO Mol Med*. – 2012. – V. 4, N 8. – P. 675-684.
319. Saxena M., Stephens M.A., Pathak H., Rangarajan A. Transcription factors that mediate epithelial–mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters // *Cell death & disease*. – 2011. – V. 2, N 7. – P. e179.
320. Schildkraut J.M., Goode E.L., Clyde M.A., Iversen E.S., Moorman P.G., Berchuck A., Marks J.R., Lissowska J., Brinton L., Peplonska B., Cunningham J.M., Vierkant R.A., Rider D.N., Chenevix-Trench G., Webb P.M., Beesley J., Chen X., Phelan C., Sutphen R., Sellers T.A., Pearce L., Wu A.H., Van Den Berg D., Conti D., Elund C.K., Anderson R., Goodman M.T., Lurie G., Carney M.E., Thompson P.J., Gayther S.A., Ramus S.J., Jacobs I., Kruger Kjaer S., Hogdall E., Blaakaer J., Hogdall C., Easton D.F., Song H., Pharoah P.D., Whittemore A.S., McGuire V., Quaye L., Anton-Culver H., Ziogas A., Terry K.L., Cramer D.W., Hankinson S.E., Tworoger S.S., Calingaert B., Chanock S., Sherman M., Garcia-Closas M. Single nucleotide polymorphisms in the TP53 region and susceptibility to invasive epithelial ovarian cancer // *Cancer Res*. – 2009. – V. 69, N 6. – P. 2349-2357.
321. Schinkel A.H., Jonker J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – V. 64. – P. 138-153.
322. Schneider B.P., Winer E.P., Foulkes W.D., Garber J., Perou C.M., Richardson A., Sledge G.W., Carey L.A. Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets // *Clinical Cancer Research*. – 2008. – V. 14, N 24. – P. 8010-8018.
323. Schneider J., Gonzalez-Roces S., Pollán M., Lucas R., Tejerina A., Martin M., Alba A. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy // *Breast Cancer Research*. – 2001. – V. 3, N 3. – P. 183-191.
324. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the consensus conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26-28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *Cancer*. – 2004. – V. 100, N 12. – P. 2512-2532.
325. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *The Breast Journal*. – 2004. – V. 10, N 4. – P. 273-294.
326. Scotto K.W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters // *Oncogene*. – 2003. – V. 22, N 47. – P. 7496-7511.
327. Senkus E., Kyriakides S., Penault-Llorca F., Poortmans P., Thompson A., Zackrisson S., Cardoso F. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up // *Annals of Oncology*. – 2013. – V. 24, N suppl 6. – P. vi7-vi23.

328. Seol H., Lee H.J., Choi Y., Lee H.E., Kim Y.J., Kim J.H., Kang E., Kim S.W., Park S.Y. Intratumoral heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancer: its clinicopathological significance // *Mod Pathol.* – 2012. – V. 25, N 7. – P. 938-948.
329. Shannon B.A., Iacopetta B.J. Methylation of the hMLH1, p16, and MDR1 genes in colorectal carcinoma: associations with clinicopathological features // *Cancer Lett.* – 2001. – V. 167, N 1. – P. 91-97.
330. Sharma G., Mirza S., Parshad R., Srivastava A., Datta Gupta S., Pandya P., Ralhan R. CpG hypomethylation of MDR1 gene in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients // *Clin Biochem.* – 2010. – V. 43, N 4-5. – P. 373-379.
331. Shibata D. Cancer. Heterogeneity and tumor history // *Science.* – 2012. – V. 336, N 6079. – P. 304-305.
332. Shiloh Y. ATM (ataxia telangiectasia mutated): expanding roles in the DNA damage response and cellular homeostasis // *Biochem Soc Trans.* – 2001. – V. 29, N Pt 6. – P. 661-666.
333. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity // *Nat Rev Cancer.* – 2003. – V. 3, N 3. – P. 155-168.
334. Singh L.C., Chakraborty A., Mishra A.K., Devi T.R., Sugandhi N., Chintamani C., Bhatnagar D., Kapur S., Saxena S. Study on predictive role of AR and EGFR family genes with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer in Indian women // *Med Oncol.* – 2012. – V. 29, N 2. – P. 539-546.
335. Siva A.C., Raval-Fernandes S., Stephen A.G., LaFemina M.J., Scheper R.J., Kickhoefer V.A., Rome L.H. Up-regulation of vaults may be necessary but not sufficient for multidrug resistance // *International Journal of Cancer.* – 2001. – V. 92, N 2. – P. 195-202.
336. Smid M., Hoes M., Sieuwerts A.M., Sleijfer S., Zhang Y., Wang Y., Foekens J.A., Martens J.W. Patterns and incidence of chromosomal instability and their prognostic relevance in breast cancer subtypes // *Breast Cancer Research and Treatment.* – 2011. – V. 128, N 1. – P. 23-30.
337. Smith I.C., Heys S.D., Hutcheon A.W., Miller I.D., Payne S., Gilbert F.J., Ah-See A.K., Eremin O., Walker L.G., Sarkar T.K., Eggleton S.P., Ogston K.N. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: significantly enhanced response with docetaxel // *J Clin Oncol.* – 2002. – V. 20, N 6. – P. 1456-66.
338. Breast tumours. / Sobin L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind C.: Wiley Online Library, 2010.
339. Sotiriou C., Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer // *New England Journal of Medicine.* – 2009. – V. 360, N 8. – P. 790-800.
340. Soussi T. The p53 pathway and human cancer // *British Journal of Surgery.* – 2005. – V. 92, N 11. – P. 1331-1332.
341. Soussi T., Wiman K.G. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm // *Cancer Cell.* – 2007. – V. 12, N 4. – P. 303-312.
342. Stavrovskaya A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells // *Biochemistry Moskow.* – 2000. – V. 65, N 1. – P. 95-106.
343. Steele M.P., Schwartz D.A. Molecular mechanisms in progressive idiopathic pulmonary fibrosis // *Annual review of medicine.* – 2013. – V. 64. – P. 265-276.
344. Stott S.L., Hsu C.H., Tsukrov D.I., Yu M., Miyamoto D.T., Waltman B.A., Rothenberg S.M., Shah A.M., Smas M.E., Korir G.K., Floyd F.P., Jr., Gilman A.J., Lord J.B., Winokur D., Springer S., Irimia D., Nagrath S., Sequist L.V., Lee R.J., Isselbacher K.J., Maheswaran S., Haber D.A., Toner M. Isolation of circulating tumor cells using a microvortex-generating herringbone-chip // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107, N 43. – P. 18392-7.
345. Sui H., Fan Z., Li Q. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated multiple drug resistance in human cancer cells // *Journal of International Medical Research.* – 2012. – V. 40, N 2. – P. 426-435.
346. Sullivan G.F., Yang J.-M., Vassil A., Yang J., Bash-Babula J., Hait W.N. Regulation of expression of the multidrug resistance protein MRP1 by p53 in human prostate cancer cells // *Journal of Clinical Investigation.* – 2000. – V. 105, N 9. – P. 1261-1267.

347. Surowiak P., Materna V., Matkowski R., Szczuraszek K., Kornafel J., Wojnar A., Pudelko M., Diemel M., Denkert C., Zabel M. Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance // *Breast Cancer Res.* – 2005. – V. 7, N 5. – P. R862-870.
348. Swanton C. Intratumor Heterogeneity: Evolution through Space and Time // *Cancer Res.* – 2012. – V. 72, N 19. – P. 4875-4882.
349. Szakács G., Annereau J.P., Lababidi S., Shankavaram U., Arciello A., Bussey K.J., Reinhold W., Guo Y., Kruh G.D., Reimers M. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells // *Cancer Cell.* – 2004. – V. 6, N 2. – P. 129-137.
350. Szakacs G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M. Targeting multidrug resistance in cancer // *Nat Rev Drug Discov.* – 2006. – V. 5, N 3. – P. 219-34.
351. Szakacs G., Váradi A., Özvegy-Laczka C., Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox) // *Drug discovery today.* – 2008. – V. 13, N 9. – P. 379-393.
352. Szakács G., Wah K.K., Polgár O., Robey R.W., Bates S.E. Multidrug resistance mediated by MDR-ABC transporters // *Drug Resistance in Cancer Cells.* – 2009. – P. 1-20.
353. Tada Y., Wada M., Kuroiwa K., Kinugawa N., Harada T., Nagayama J., Nakagawa M., Naito S., Kuwano M. MDR1 gene overexpression and altered degree of methylation at the promoter region in bladder cancer during chemotherapeutic treatment // *Clin Cancer Res.* – 2000. – V. 6, N 12. – P. 4618-4627.
354. Talluri S., Dick F.A. Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: here, there and everywhere // *Cell Cycle.* – 2012. – V. 11, N 17. – P. 3189-3198.
355. Tamaki A., Ierano C., Szakacs G., Robey R.W., Bates S.E. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology // *Essays in Biochemistry.* – 2011. – V. 50, N 1. – P. 209-232.
356. Tew K.D. Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54, N 16. – P. 4313-4320.
357. Theillet C. What do we learn from HER2-positive breast cancer genomic profiles? // *Breast Cancer Research.* – 2010. – V. 12, N 3. – P. 107-109.
358. Thomas M., Kalita A., Labrecque S., Pim D., Banks L., Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically // *Molecular and cellular biology.* – 1999. – V. 19, N 2. – P. 1092-1100.
359. Thottassery J.V., Zambetti G.P., Arimori K., Schuetz E.G., Schuetz J.D. p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – V. 94, N 20. – P. 11037-11042.
360. Tian T., Olson S., Whitacre J.M., Harding A. The origins of cancer robustness and evolvability // *Integr Biol (Camb).* – 2011. – V. 3, N 1. – P. 17-30.
361. Tiezzi D.G., Andrade J.M., Ribeiro-Silva A., Zola F.E., Marana H.R., Tiezzi M.G. HER-2, p53, p21 and hormonal receptors proteins expression as predictive factors of response and prognosis in locally advanced breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel plus epirubicin combination // *BMC Cancer.* – 2007. – V. 7. – P. 36-48.
362. To K.K., Polgar O., Huff L.M., Morisaki K., Bates S.E. Histone modifications at the ABCG2 promoter following treatment with histone deacetylase inhibitor mirror those in multidrug-resistant cells // *Molecular Cancer Research.* – 2008. – V. 6, N 1. – P. 151-164.
363. Toyama T., Zhang Z., Nishio M., Hamaguchi M., Kondo N., Iwase H., Iwata H., Takahashi S., Yamashita H., Fujii Y. Association of TP53 codon 72 polymorphism and the outcome of adjuvant therapy in breast cancer patients // *Breast Cancer Res.* – 2007. – V. 9, N 3. – P. R34.
364. Toyoda Y., Hagiya Y., Adachi T., Hoshijima K., Kuo M., Ishikawa T. MRP class of human ATP binding cassette (ABC) transporters: historical background and new research directions // *Xenobiotica.* – 2008. – V. 38, N 7-8. – P. 833-862.

365. Trock B.J., Leonessa F., Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance // *J Natl Cancer Inst.* – 1997. – V. 89, N 13. – P. 917-931.
366. Tuna M., Smid M., Martens J.W., Foekens J.A. Prognostic value of acquired uniparental disomy (aUPD) in primary breast cancer // *Breast Cancer Research and Treatment.* – 2012. – V. 132, N 1. – P. 189-196.
367. Turner N.C., Reis-Filho J.S. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance // *The Lancet Oncology.* – 2012. – V. 13, N 4. – P. e178-e185.
368. Tusnády G.E., Sarkadi B., Simon I., Váradi A. Membrane topology of human ABC proteins // *FEBS letters.* – 2006. – V. 580, N 4. – P. 1017-1022.
369. Ueda K., Pastan I., Gottesman M.M. Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene // *Journal of Biological Chemistry.* – 1987. – V. 262, N 36. – P. 17432-17436.
370. Vaclavikova R., Nordgard S.H., Alnaes G.I., Hubackova M., Kubala E., Kodet R., Mrhalova M., Novotny J., Gut I., Kristensen V.N. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (ABCB1): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients // *Pharmacogenetics and genomics.* – 2008. – V. 18, N 3. – P. 263-273.
371. Valero V., Forbes J., Pegram M.D., Pienkowski T., Eiermann W., von Minckwitz G., Roche H., Martin M., Crown J., Mackey J.R. Multicenter phase III randomized trial comparing docetaxel and trastuzumab with docetaxel, carboplatin, and trastuzumab as first-line chemotherapy for patients with HER2-gene-amplified metastatic breast cancer (BCIRG 007 study): two highly active therapeutic regimens // *Journal of Clinical Oncology.* – 2011. – V. 29, N 2. – P. 149-156.
372. Van Brussel J.P., Jan Van Steenbrugge G., Van Krimpen C., Bogdanowicz J.F., Van der Kwast T.H., Schröder F.H., Mickisch G.H. Expression of multidrug resistance related proteins and proliferative activity is increased in advanced clinical prostate cancer // *The Journal of urology.* – 2001. – V. 165, N 1. – P. 130-135.
373. Van Dekken H., van Marion R., Vissers K., Hop W., Dinjens W., Tilanus H., Wink J., van Duin M. Molecular dissection of the chromosome band 7q21 amplicon in gastroesophageal junction adenocarcinomas identifies cyclin-dependent kinase 6 at both genomic and protein expression levels // *Genes, Chromosomes and Cancer.* – 2008. – V. 47, N 8. – P. 649-656.
374. van der Hage J.A., van de Velde C.J., Julien J.P., Tubiana-Hulin M., Vandervelden C., Duchateau L. Preoperative chemotherapy in primary operable breast cancer: results from the European Organization for Research and Treatment of Cancer trial 10902 // *J Clin Oncol.* – 2001. – V. 19, N 22. – P. 4224-4237.
375. van Herwaarden A.E., Wagenaar E., Merino G., Jonker J.W., Rosing H., Beijnen J.H., Schinkel A.H. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk // *Molecular and cellular biology.* – 2007. – V. 27, N 4. – P. 1247-1253.
376. Varna M., Bousquet G., Plassa L.-F., Bertheau P., Janin A. TP53 status and response to treatment in breast cancers // *BioMed Research International.* – 2011. – V. 2011. doi:10.1155/2011/284584
377. Vaziri C., Saxena S., Jeon Y., Lee C., Murata K., Machida Y., Wagle N., Hwang D.S., Dutta A. A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication // *Mol Cell.* – 2003. – V. 11, N 4. – P. 997-1008.
378. Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold // *The EMBO journal.* – 1982. – V. 1, N 8. – P. 945-953.
379. Wang C.S., Larue H., Fortin A., Gariépy G., Têtu B. *mdr1* mRNA expression by RT-PCR in patients with primary breast cancer submitted to neoadjuvant therapy // *Breast Cancer Research and Treatment.* – 1997. – V. 45, N 1. – P. 63-74.

380. Wang W., McLeod H.L., Cassidy J. Disulfiram-mediated inhibition of NF- κ B activity enhances cytotoxicity of 5-fluorouracil in human colorectal cancer cell lines // *International Journal of Cancer*. – 2003. – V. 104, N 4. – P. 504-511.
381. Wartenberg M., Donmez F., Ling F.C., Acker H., Hescheler J., Sauer H. Tumor-induced angiogenesis studied in confrontation cultures of multicellular tumor spheroids and embryoid bodies grown from pluripotent embryonic stem cells // *FASEB J*. – 2001. – V. 15, N 6. – P. 995-1005.
382. Weigelt B., Geyer F.C., Reis-Filho J.S. Histological types of breast cancer: how special are they? // *Molecular oncology*. – 2010. – V. 4, N 3. – P. 192-208.
383. Weigelt B., Geyer F.C., Reis-Filho J.S. Histological types of breast cancer: how special are they? // *Molecular oncology*. – 2010. – V. 4, N 3. – P. 192-203.
384. Weigman V.J., Chao H.-H., Shabalin A.A., He X., Parker J.S., Nordgard S.H., Grushko T., Huo D., Nwachukwu C., Nobel A. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2012. – V. 133, N 3. – P. 865-880.
385. Weinstein-Oppenheim C.R., Henriquez-Roldan C.F., Davis J.M., Navolanic P.M., Saleh O.A., Steelman L.S., Franklin R.A., Robinson P.J., McMahon M., McCubrey J.A. Role of the Raf signal transduction cascade in the in vitro resistance to the anticancer drug doxorubicin // *Clin Cancer Res*. – 2001. – V. 7, N 9. – P. 2898-907.
386. Westerterp M., Bochem A.E., Yvan-Charvet L., Murphy A.J., Wang N., Tall A.R. ATP-Binding Cassette Transporters, Atherosclerosis, and Inflammation // *Circulation research*. – 2014. – V. 114, N 1. – P. 157-170.
387. Widschwendter M., Jones P.A. DNA methylation and breast carcinogenesis // *Oncogene*. – 2002. – V. 21, N 35. – P. 5462-82.
388. Wiedemeyer R., Brennan C., Heffernan T.P., Xiao Y., Mahoney J., Protopopov A., Zheng H., Bignell G., Furnari F., Cavenee W.K. Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development // *Cancer Cell*. – 2008. – V. 13, N 4. – P. 355-364.
389. Wikman H., Sielaff-Frimpong B., Kropidlowski J., Witzel I., Milde-Langosch K., Sauter G., Westphal M., Lamszus K., Pantel K. Clinical Relevance of Loss of 11p15 in Primary and Metastatic Breast Cancer: Association with Loss of PRKCDBP Expression in Brain Metastases // *PLoS ONE*. – 2012. – V. 7, N 10. – P. e47537.
390. Wilting R.H., Dannenberg J.H. Epigenetic mechanisms in tumorigenesis, tumor cell heterogeneity and drug resistance // *Drug Resistance Updates*. – 2012. – V. 15. – P. 21-38.
391. Winchester D., Winchester D. Atlas of Clinical Oncology Breast Cancer. BC Decker // *Book Atlas of Clinical Oncology Breast Cancer*. BC Decker / EditorInc, 2000.
392. Wind N., Holen I. Multidrug Resistance in Breast Cancer—From In Vitro Models to Clinical Studies // *International Journal of Breast Cancer*. – 2011. – V. 2011. – P. 1-12.
393. Wishart G.C., Plumb J.A., Going J.J., McNicol A.M., McArdle C.S., Tsuruo T., Kaye S.B. P-glycoprotein expression in primary breast cancer detected by immunocytochemistry with two monoclonal antibodies // *Br J Cancer*. – 1990. – V. 62, N 5. – P. 758-61.
394. Wolff A.C., Hammond M.E., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A., McShane L.M., Paik S., Pegram M.D., Perez E.A., Press M.F., Rhodes A., Sturgeon C., Taube S.E., Tubbs R., Vance G.H., van de Vijver M., Wheeler T.M., Hayes D.F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer // *Arch Pathol Lab Med*. – 2007. – V. 131, N 1. – P. 18-43.
395. Wolff A.C., Hammond M.E.H., Schwartz J.N., Hagerty K.L., Allred D.C., Cote R.J., Dowsett M., Fitzgibbons P.L., Hanna W.M., Langer A. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer // *Archives of pathology & laboratory medicine*. – 2007. – V. 131, N 1. – P. 18-43.

396. Wolmark N., Wang J., Mamounas E., Bryant J., Fisher B. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 // *J Natl Cancer Inst Monogr.* – 2001. N 30. – P. 96-102.
397. Xu Y., DuanMu H., Chang Z., Zhang S., Li Z., Li Z., Liu Y., Li K., Qiu F., Li X. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast cancer // *Molecular biology reports.* – 2012. – V. 39, N 2. – P. 1627-1637.
398. Xu Y., Jiang Z., Yin P., Li Q., Liu J. Role for Class I histone deacetylases in multidrug resistance // *Experimental cell research.* – 2012. – V. 318, N 3. – P. 177-186.
399. Xu Y., Yao L., Ouyang T., Li J., Wang T., Fan Z., Lin B., Lu Y., Xie Y. p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer // *Clinical Cancer Research.* – 2005. – V. 11, N 20. – P. 7328-7333.
400. Yan L., Cuihuan W., Bing Y. Expression of COX-2 and P-gp in Non-small Cell Lung Cancer and Its Relation to Human Papillomavirus Infection // *Acta Medicinae Universitatis Scientiae et Technologiae Huazhong.* – 2007. – V. 6. – P. 002.
401. Yan L., Zhang D., Chen C., Mao Y., Xie Y., Li Y., Huang Y., Han B. TP53 Arg72Pro polymorphism and lung cancer risk: a meta-analysis // *Int J Cancer.* – 2009. – V. 125, N 12. – P. 2903-11.
402. Yanagawa M., Ikemot K., Kawauchi S., Furuya T., Yamamoto S., Oka M., Oga A., Nagashima Y., Sasaki K. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype // *BMC Research Notes.* – 2012. – V. 5, N 1. – P. 376.
403. Yang J., Luo H., Li Y., Li J., Cai Z., Su X., Dai D., Du W., Chen T., Chen M. Intratumoral heterogeneity determines discordant results of diagnostic tests for human epidermal growth factor receptor (HER) 2 in gastric cancer specimens // *Cell biochemistry and biophysics.* – 2012. – V. 62, N 1. – P. 221-228.
404. Yasuhisa K., Shin-ya M., Michinori M., Kazumitsu U. Mechanism of multidrug recognition by MDR1/ABCB1 // *Cancer Science.* – 2007. – V. 98, N 9. – P. 1303-1310.
405. Ye D., Lammers B., Zhao Y., Meurs I., JC Van Berkel T., Van Eck M. ATP-binding cassette transporters A1 and G1, HDL metabolism, cholesterol efflux, and inflammation: important targets for the treatment of atherosclerosis // *Current drug targets.* – 2011. – V. 12, N 5. – P. 647-660.
406. Yu M., Stott S., Toner M., Maheswaran S., Haber D.A. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization // *J Cell Biol.* – 2011. – V. 192, N 3. – P. 373-82.
407. Yvan-Charvet L., Pagler T., Gautier E.L., Avagyan S., Siry R.L., Han S., Welch C.L., Wang N., Randolph G.J., Snoeck H.W. ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation // *Science.* – 2010. – V. 328, N 5986. – P. 1689-1693.
408. Zavjalova M.V., Perelmutter V.M., Slonimskaya E.M., Vtorushin S.V., Garbukov E.Y., Gluschenko S.A. Conjugation of lymphogenous metastatic spread and histologic pattern of infiltrative component of ductal breast cancer // *Siberian Journal of Oncology.* – 2006. N 1. – P. 32-35.
409. Zavyalova M., Perelmutter V., Vtorushin S., Denisov E., Litvyakov N., Slonimskaya E., Cherdyntseva N. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis // *Diagnostic Cytopathology.* – 2011 P. 279-282. doi: 10.1002/dc.21852.
410. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Gerashchenko T.S., Litviakov N.V., Skryabin N.A., Vtorushin S.V., Telegina N.S., Slonimskaya E.M., Cherdyntseva N.V., Perelmutter V.M. Phenotypic drift as a cause for intratumoral morphological heterogeneity of invasive ductal breast carcinoma not otherwise specified // *BioResearch Open Access.* – 2013. – V. 2, N 2. – P. 148-154.

411. Zhang B., Zhang Q., Zhao L., Long F., Li S., Jiang D.Q., Xu H. [Assessment of neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients] // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* – 2006. – V. 28, N 11. – P. 867-70.
412. Zhang F., Yang Y., Smith T., Kau S.W., McConathy J.M., Esteva F.J., Kuerer H.M., Symmans W.F., Buzdar A.U., Hortobagyi G.N., Pusztai L. Correlation between HER-2 expression and response to neoadjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in patients with breast carcinoma // *Cancer.* – 2003. – V. 97, N 7. – P. 1758-65.
413. Zhang W., Petrovic J.-M., Andrade M.F., Zhang H., Ball M., Stanimirovic D.B. The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels // *The FASEB Journal.* – 2003. – V. 17, N 14. – P. 2085-2087.
414. Zhang Y., Martens J.W., Jack X.Y., Jiang J., Sieuwerts A.M., Smid M., Klijn J.G., Wang Y., Foekens J.A. Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer // *Cancer Research.* – 2009. – V. 69, N 9. – P. 3795-3801.
415. Zhang Z., Wang M., Wu D., Tong N., Tian Y. P53 codon 72 polymorphism contributes to breast cancer risk: a meta-analysis based on 39 case-control studies // *Breast Cancer Res Treat.* – 2010. – V. 120, N 2. – P. 509-517.
416. Zheng T., Wang J., Chen X., Liu L. Role of microRNA in anticancer drug resistance // *International Journal of Cancer.* – 2010. – V. 126, N 1. – P. 2-10.
417. Zhou L., Naraharisetti S.B., Wang H., Unadkat J.D., Hebert M.F., Mao Q. The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) limits fetal distribution of glyburide in the pregnant mouse: an Obstetric-Fetal Pharmacology Research Unit Network and University of Washington Specialized Center of Research Study // *Molecular pharmacology.* – 2008. – V. 73, N 3. – P. 949-959.
418. Zhu Y., Alvarez C., Doll R., Kurata H., Schebye X.M., Parry D., Lees E. Intra-S-phase checkpoint activation by direct CDK2 inhibition // *Mol Cell Biol.* – 2004. – V. 24, N 14. – P. 6268-6277.