

На правах рукописи

Литвяков Николай Васильевич

**РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ
ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**

14.01.12 – онкология (биологические науки)

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени доктора биологических наук

Томск 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт онкологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук и Национальном исследовательском Томском государственном университете

Научный консультант:

Чердынцева Надежда Викторовна доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН

Официальные оппоненты:

– доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой онкологии ФГБОУВПО «Санкт-Петербургский государственный университет» Правительства РФ Орлова Рашида Вахидовна

– доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии Санкт-Петербургской государственной химико-фармацевтической академии Комов Вадим Петрович

– доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией эпигенетики Медико-генетического научного центра РАМН Залетаев Дмитрий Владимирович

Ведущая организация – ФГБУ «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» РАМН

Защита состоится «09» декабря 2014 г. в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.052.01 при ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758 г. Санкт–Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68. Тел.: (812) 456-78-98, Факс: (812) 596-89-47.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758 г. Санкт–Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, д. 68 и на сайте <http://www.niioncologii.ru/sites/default/files/files/20142208173459.pdf>

Автореферат разослан «__» 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук

Е.В. Бахидзе

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Предоперационная (неоадьювантная) химиотерапия (НАХТ) показана для использования у больных с местно-распространенным раком молочной железы (РМЖ) IIIA, IIIB, или IIIC стадий и может применяться у пациентов с IIA (T_2N_0 или T_1N_1) или IIIB (T_2N_1 или T_3N_0) стадиями РМЖ. НАХТ предназначена для уменьшения объема первичной опухоли и уровня региональной лимфаденопатии, обеспечивая выполнение радикального оперативного вмешательства, органосохранного лечения, а также позволяет оценивать чувствительность к послеоперационной химиотерапии [Goldhirsch A., et al., 2013, Kaufmann M., et al., 2012, Schwartz G.F., et al., 2004, Senkus E., et al., 2013, Семиглазов В.Ф., и др., 2008]. В этой связи очень важно, чтобы у больных отмечался хороший ответ на химиотерапию (полная или частичная регрессия опухоли) [Bertheau P., et al., 2005, Kaufmann M., et al., 2006, Kuerer H.M., et al., 1998, Wolmark N., et al., 2001].

Основной причиной неэффективности химиотерапии злокачественных опухолей считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), который характеризуется способностью опухолевых клеток выживать в условиях высоких доз широкого спектра химиопрепараторов. Выделяют два типа МЛУ: предсуществующая МЛУ, ее определяют индивидуальные особенности опухоли и организма больного, кроме того, она зависит от гистогенеза опухоли, в частности высокая предсуществующая МЛУ отмечена у опухолей, происходящих из метаболически 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 ABC-транспортеров (ATP-Binding Cassette), их работу считают мажорным механизмом лекарственной устойчивости [Gillet J.P., et al., 2012]. 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 [Amiri-Kordestani L., et al., 2012, Eechoute K., et al., 2011, Schinkel A.H., et al., 2012].

Роль генов ABC-транспортеров в формировании фенотипа предсуществующей и адаптивной МЛУ была доказана в опытах *in vitro* с использованием подходов по индукции генной экспрессии и трансфекции генов ABC в чувствительные к цитостатикам линии клеток [Allen J.D., et al., 2000, Gottesman M.M., et al., 2006, Hembruff S.L., et al., 2008]. В исследованиях *in vitro* определены многие механизмы активации экспрессии ABC-транспортеров при воздействии химиопрепараторов и росте опухоли [Chen K.G., et al., 2012].

Данные о связи исходного уровня экспрессии ABC-транспортеров (определяющего предсуществующую МЛУ) с непосредственной эффективностью

химиотерапии, общей и безметастатической выживаемостью пациентов крайне противоречивы для опухолей человека, в частности, для рака молочной железы, [Chintamani, et al., 2005, Faneyte I.F., et al., 2004, Fletcher J.I., et al., 2010, Gillet J.P., et al., 2007, Park S., et al., 2006].

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 [Atalay C., et al., 2006, Kim B., et al., 2013, Leonessa F., et al., 2003, Wind N., et al., 2011]. Полученные данные 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.

Хорошо изучены механизмы активации экспрессии генов ABC в опухолевых клетках, обеспечивающие резистентность к химиопрепаратам [Chen K.G., et al., 2012, Schinkel A.H., et al., 2012]. Напротив, связанные с ABC-транспортерами механизмы, определяющие ответ опухоли на химиотерапию, практически не известны. Одним из таких потенциальных механизмов, теоретически способных обеспечить эффективный ответ на химиотерапию, может выступать регуляторное действие продукта гена опухолевой супрессии *TP53*, 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 химиопрепараторов [Han S., et al., 2010, McClelland S.E., et al., 2009]. Наконец адаптационные изменения опухолевых клонов в процессе химиотерапии способны обеспечивать вариабельность ее эффективности у разных индивидуумов.

В настоящей работе внимание было сосредоточено на исследовании ключевых генов 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 вместе с ABC-транспортерами [Mossink M.H., et al., 2003].

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 управления фенотипом МЛУ в опухоли молочной железы.

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 неоадьюванной 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 опухолевой супрессии *TP53* на регуляцию экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы
8. Определить роль хромосомных аномалий опухоли 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-транспортеров в опухолевой ткани молочной железы в процессе лечения с клинической эффективностью НАХТ. В реализации эффекта НАХТ играет роль адаптивная множественная лекарственная устойчивость, которая формируется за счет повышения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе химиотерапии. Впервые установлен феномен снижения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли в ответ на воздействие химиопрепаратов. 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 клинико-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 указанных ABC-транспортеров в процессе НАХТ ассоциировано с гематогенным метастазированием.

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

Впервые исследована связь разных морфологических структур инфильтративного компонента рака молочной железы с характером изменений экспрессии ABC-транспортеров 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 Arg72Pro rs1042522* и делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* оказывают влияние на изменение 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 локусы в ДНК опухоли молочной железы, несбалансированные хромосомные аномалии которых 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. формирования ответа опухоли на химиопрепараты. На основе оценки этих нарушений в опухоли до лечения можно прогнозировать ожидаемую эффективность НАХТ. Нарушение механизмов up-регуляции генов ABC является характерным для клинической опухоли аберрантным явлением.

На основе микроматричных исследований изменения мутантных опухолевых клонов в процессе НАХТ впервые выявлено появление новых мутантных клонов у некоторых больных, при этом у них 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.

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. Он 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 и является еще одним новым прогностическим фактором.

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

Положения выносимые на защиту

Отсутствие клинического ответа на неоадьювантную 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 являются чувствительными к действию химиопрепаратов 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.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было обследовано 145 больных РМЖ с морфологически верифицированным диагнозом, клинической стадией IIА – IIIС ($T_{1-4}N_{0-3}M_0$) люминального В, трижды-негативного и HER2-позитивного подтипов, в возрасте 28–68 лет (средний возраст $47,43 \pm 0,78$ лет), получавших 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. Все обследованные больные имели IIА – IIIС 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 неоадьювантном режиме получали 2-4 курса химиотерапии по схемам FAC (5-fluorouracil 600 mg/m^2 , adriamycin 50 mg/m^2 и cyclophosphamide 600 mg/m^2 один раз в 3 недели), CAХ (cyclophosphamide 100 mg/m^2 внутримышечно, adriamycin 30 mg/m^2 внутривенно, xeloda 1200 mg/m^2 перорально), или монотерапия таксoterом (100 mg/m^2 часовая инфузия в день). Через 3-5 недель после НАХТ проводилась операция, затем 2 курса адьювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ с помощью УЗИ и/или маммографии.

Основную исследовательскую группу составили 120 больных. У них была изучена экспрессия генов ABC в биопсийном материале до лечения и генов и белков ABC-транспортеров в операционном материале после НАХТ. 25 больных РМЖ составили независимую группу для изучения динамики изменения экспрессии генов ABC в процессе 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.

Для выполнения исследований была создана и зарегистрирована электронная база данных: Свидетельство о государственной регистрации базы данных

№ 2013621213 от 24 сентября 2013 г. «База данных экспрессионных и клинико-патологических параметров пациентов с диагнозом рак молочной железы»

Забор опухолевого материала. Для молекулярных исследований были использованы биопсийные опухолевые образцы ($\sim 10 \text{ mm}^3$), 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 ($\sim 60\text{--}70 \text{ mm}^3$) после НАХТ (для обеих групп). Образцы опухоли помещали в раствор RNALater (Ambion, USA) и сохраняли при температуре -80°C (после 24-часовой инкубации при $+4^\circ\text{C}$) для дальнейшего выделения РНК и ДНК. Для морфологических исследований забор тканей проводился в течение первого часа после выполнения операций. Взятые образцы помещались в 10% рН-нейтральный формалин.

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. РНК выделяли с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany, #74134). На спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) оценивали концентрацию и чистоту выделения РНК. Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,95\text{--}2,05$; $A_{260}/A_{230} = 1,90\text{--}2,31$.

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.

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). Концентрация составила от 50 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2.10\text{--}2.35$; $A_{260}/A_{230} = 2.15\text{--}2.40$. 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), фрагменты ДНК, в основном, имеют массу более 48 кбп.

Количественная ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени. Уровень экспрессии генов МЛУ: *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). Технология ПЦР подробно описана в нашей публикации (Litviakov N.V., et al. Changing the expression vector of multidrug resistance genes is related to neoadjuvant chemotherapy response. //Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2013, Vol.71 N.1 P.153-163). Относительная экспрессия МЛУ была оценена с помощью метода Pfaffl в условных единицах относительно гена рефери *GAPDH*.

Генотипирование по SNP-маркерам. Генотипирование проводили при помощи ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе "CFX96" Bio-Rad Laboratories". Праймеры и зонды были разработаны при помощи программы "Vector NTI 11.5" (Invitrogen, USA) (Литвиаков Н.В. и др. 2010).

Метилчувствительная ПЦР. Для детекции метилирования CpG островков промоторных областей ABC-транспортеров использовали метилчувствительную ПЦР [Petrenko A., et al., 2000]. Этот метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз (*Hpa*II (C↓CGG) и *Hsp*aI (CGC↓G) (Сибэнзим, Россия)) гидролизовать CpG участки ДНК, не подвергшиеся метилированию и оставлять нерасщепленными 5mCG участки, содержащие метилцитозин. 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>). Для внутреннего контроля ПЦР использовали фрагмент гена *MTHFR* (80 bp).

Иммуногистохимическое исследование экспрессии белков ABC

Проводили по стандартной методике. Использовали следующие первичные моноклональные антитела: Abcb1 P-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). 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, экспрессирующих изучаемый белок.

Микроматричный анализ

Микроматричный анализ проводили на ДНК-чипах высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). Все процедуры проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G. Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 2.0» (Affymetrix, USA). При помощи программы в хромосомах определяли несбалансированные хромосомные аберрации – делеции и амплификации (Loss и Gain), представляющие собой CNA – Copy Number Aberration (аберрации числа копий) опухолевой ДНК. Практически во всех случаях CNA были мозаичными, т.е. мутантная опухолевая ДНК определялась на фоне нормальной ДНК стромы опухоли.

Статистические методы

Статистическая обработка проводилась с использованием программы «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., США). Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уитни, непараметрический критерий Вилкоксона для связанных групп. Для анализа безметастатической выживаемости использовали по метод 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 <http://vassarstats.net/odds2x2.html>.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия ABC-транспортеров в зависимости от основных клинико-морфологических параметров. На первом этапе была изучена экспрессия в опухолевой ткани ABC-транспортеров и ее связь с патогенетически значимыми клинико-морфологическими параметрами, что важно с точки зрения выявления дальнейших направлений исследований и исключения или учета в дальнейшем анализе влияния тех или иных клинических показателей.

Всего лишь несколько генов до лечения показали связь с основными клинико-патологическими параметрами: уровень экспрессии *ABCB3* ассоциирован с возрастом, *ABCC2* с менструальным статусом, *ABCG2* с размером опухоли, *ABCC5* с лимфогенным метастазированием и *ABCG1* с ER статусом. Можно полагать, что это большей частью случайные ассоциации, обусловленные большим количеством сравниваемых параметров. Эти данные объясняют слабую ассоциацию основных клинико-патологических параметров с ответом на НАХТ. В нашем исследовании экспрессия шести (двух – на уровне тенденций) из девяти ABC-транспортеров в опухоли молочной железы после НАХТ (но не до лечения) была связана с размером первичной опухоли.

Экспрессия ABC-транспортеров у больных с различной эффективностью НАХТ. Следующим этапом работы было изучение связи экспрессии генов ABC-транспортеров с непосредственным эффектом предоперационной химиотерапии. Сравнивали уровень экспрессии ABC-транспортеров 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, $n = 47$). Из всех ABC-транспортеров только уровень экспрессии гена *ABCB3* (который больше связан с функционированием иммунной системы и молекул главного комплекса гистосовместимости MHC1 и не осуществляет выброс лекарственных препаратов из клеток) в опухоли до лечения был статистически значимо выше у больных с объективным клиническим ответом. После проведения предоперационной химиотерапии происходит дивергенция групп по уровню экспрессии практически всех изученных генов в образцах опухоли 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 ($10^{-7} < p < 0,03$, по непараметрическому критерию Вилкоксона для связанных групп) (рисунок 1).

Для подтверждения этой связи был проведен анализ ассоциации частоты снижения или повышения экспрессии с эффектом НАХТ. У пациенток с объективным клиническим ответом в опухоли наблюдается снижение экспрессии генов ABC 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 ($0,02 < p < 1,1 \times 10^{-12}$) (таблица 1).

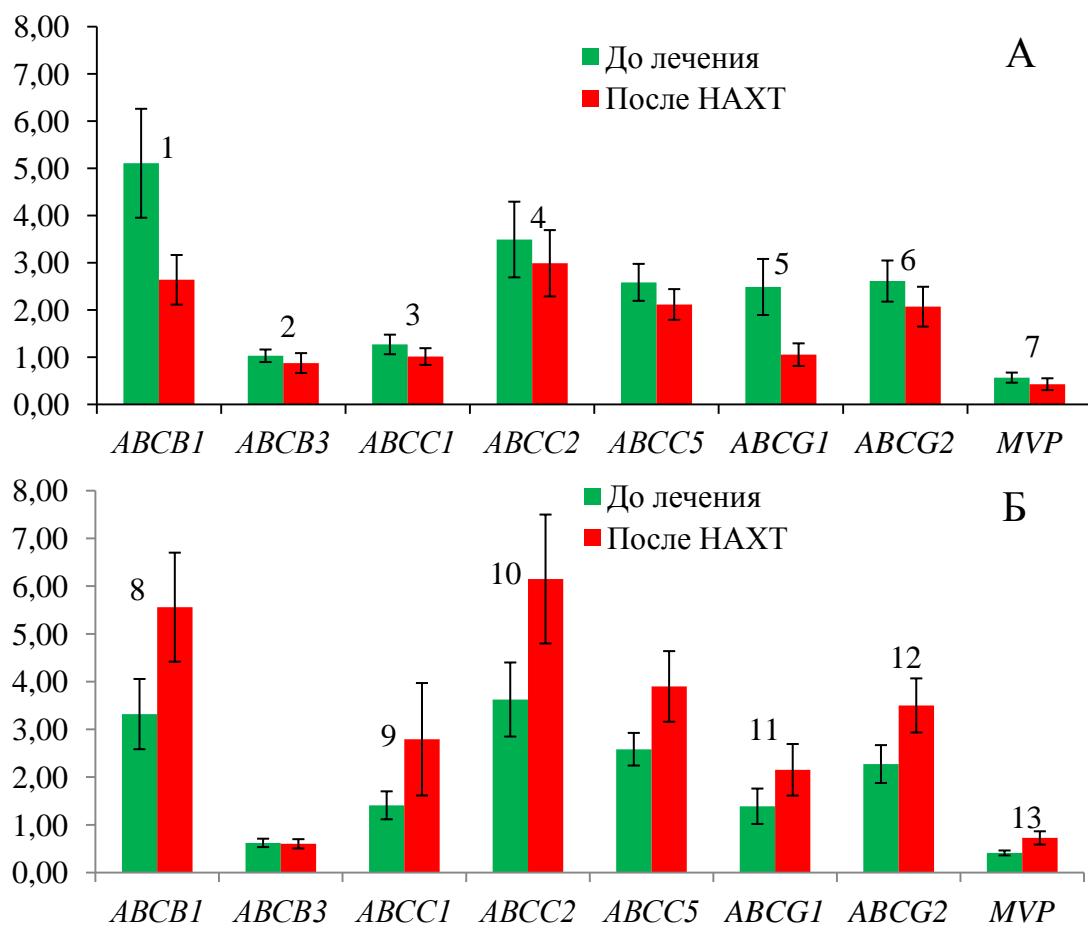


Рисунок 1. – Сравнение уровней экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы, до лечения и после НАХТ, отдельно в группах с объективным ответом (А, n=58) и с отсутствием ответа на НАХТ (Б, n=48). Статистический анализ p-value – по критерию Вилкоксона для связанных групп: 1-p=1,17x10⁻⁷; 2-p=0,008; 3-p=0,02 4-p=0,001; 5-p=0,0001; 6-p=0,000003; 7-p=0,00005; 8-p=1,51x10⁻⁷; 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 1. – 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		
ABCB1	49 (84%)	9 (16%)	6 (12%)	42 (88%)	1,1x10⁻¹²	
ABCB3	42 (74%)	15 (26%)	26 (56%)	20 (44%)	0,09	
ABCC1	39 (67%)	19 (33%)	14 (29%)	34 (71%)	0,0002	
ABCC2	44 (76%)	14 (24%)	13 (27%)	35 (73%)	6,5x10⁻⁷	
ABCC5	35 (61%)	22 (39%)	17 (37%)	29 (63%)	0,02	
ABCG1	48 (83%)	10 (17%)	16 (35%)	30 (65%)	7,1x10⁻⁷	
ABCG2	47 (81%)	11 (19%)	9 (19%)	39 (81%)	1,0x10⁻¹⁰	
MVP	47 (81%)	11 (19%)	15 (33%)	30 (67%)	0,000001	

Статистический анализ: p-value – по двустороннему критерию Фишера, полужирным шрифтом выделены статистически значимые различия.

Таким образом, нами была впервые установлена 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 (изменяющаяся в процессе лечения) МЛУ. Это обосновывает новую стратегию управления множественной лекарственной устойчивостью через регуляцию экспрессии ABC-транспортеров (а не через подавление активности белков ABC, как это предлагалось ранее [Tamaki A., et al., 2011]).

Значимость экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы для безметастатической выживаемости пациентов. Данные мировой литературы о связи предсуществующей МЛУ с прогнозом при РМЖ оказались крайне противоречивыми. Это подтверждают результаты нашего исследования, из числа всех исследованных генов только для гена *ABCB3* предсуществующий уровень экспрессии в опухоли до лечения был связан с безметастатической выживаемостью. Была оценена безметастатическая выживаемость в зависимости от повышения или снижения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ. Безметастатическая выживаемость пациентов с повышением экспрессии *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* составила 50-55%, а у больных со снижением экспрессии этих генов колебалась в пределах 73-78% (log-rank test $p = 0,032-0,0061$) (рисунок 2).

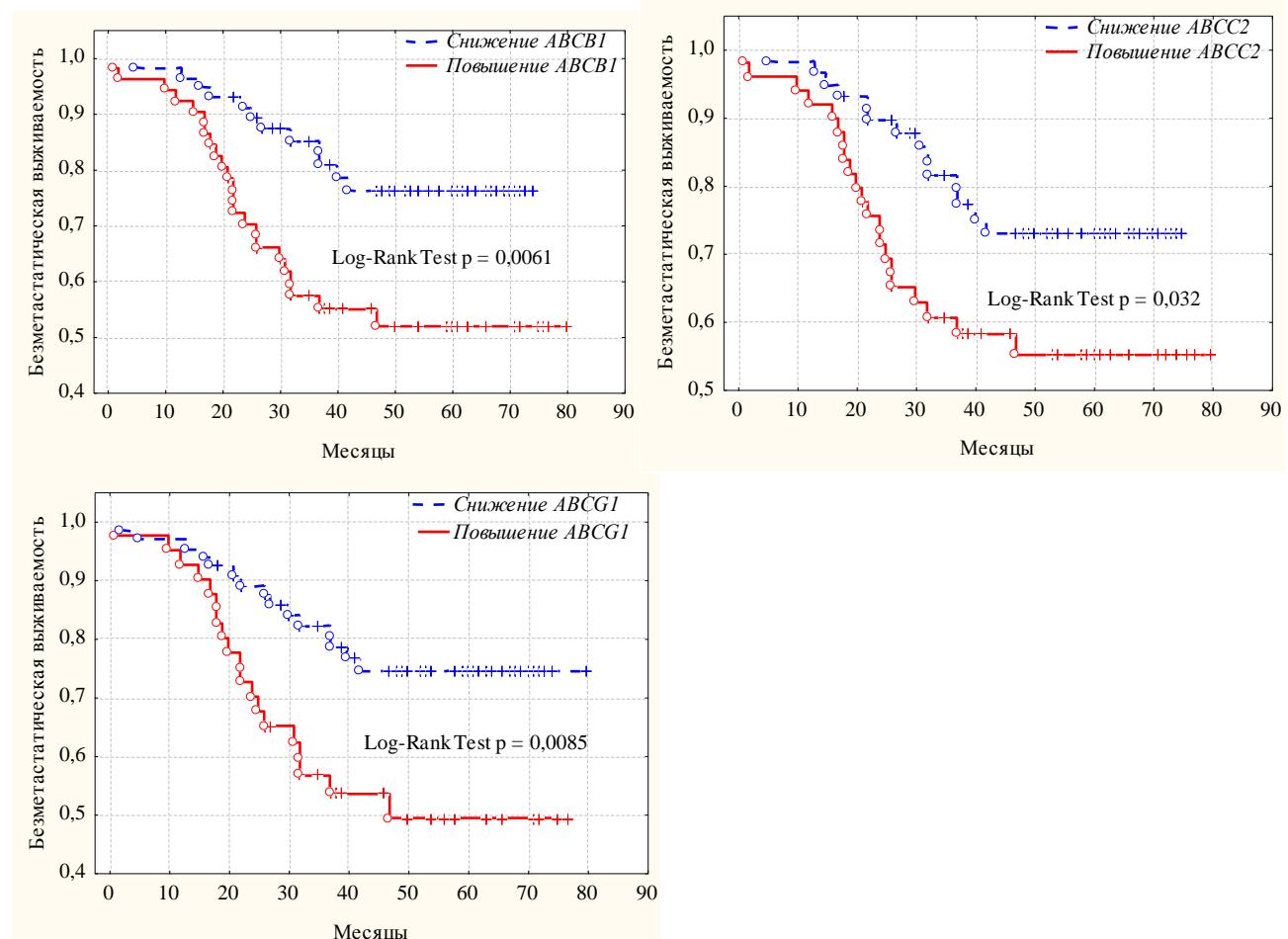


Рисунок 2. – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от изменения опухолевой экспрессии ABC-транспортеров при проведении НАХТ.

Группы со снижением и повышением экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* не различаются между собой по возрасту, менструальному статусу, размеру опухоли, частоте лимфогенного метастазирования, рецепторному статусу опухоли, по частотам молекулярных подтипов, гистологической форме и схеме НАХТ. Таким образом, изменение экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ имеет прогностическую значимость и может рассматриваться как новый потенциальный прогностический фактор, который не зависит от стандартных клинико-патологических факторов прогноза. Повышение экспрессии *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* является неблагоприятным прогностическим признаком, а снижение экспрессии является благоприятным прогностическим признаком.

Уменьшение экспрессии пяти основных генов ATP-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 связано с отсутствием непосредственного клинического 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% наблюдалось разнонаправленное изменение экспрессии пяти ABC-транспортеров, т.е. градиентный феномен отсутствовал. При наличии градиентного феномена пятилетняя безметастатическая выживаемость пациентов составила 73% против 39% у больных без градиентного феномена (log-rank test $p=0,0018$) (рисунок 3). 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 $p = 0,005$.

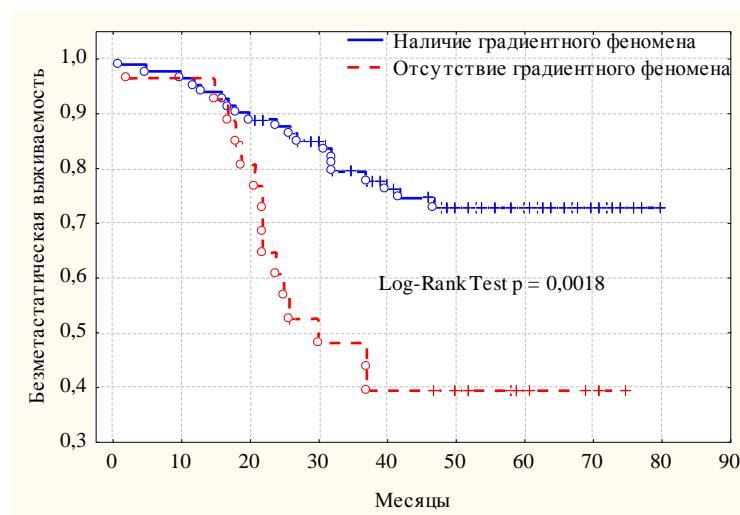


Рисунок 3 – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия градиентного феномена.

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.

Регуляция экспрессии ABC-транспортеров. 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 НАХТ, а у других – повышение экспрессии генов ABC, и это обуславливает плохой ответ.

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 [Chen K.G., et al., 2012].

Снижение экспрессии намного более непонятный и сложный феномен, и в литературе нами найдено лишь одно подтверждение феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в ответ на воздействие химиопрепаратов в клинической ситуации, которое опубликовано уже после выхода нашей статьи [Kim B., et al., 2013].

Доказательство феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы при проведении 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 ABC 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 ABC сохранялась более 80-90 дней (срок от окончания последнего курса до операции), т.е. если адаптивная МЛУ сформировалась, то она длительно сохраняется и это надо учитывать при формировании тактики лечения.

Экспрессия белков ABC-транспортеров в опухоли молочной железы. В операционном материале после проведения НАХТ у 38 больных была изучена

экспрессия семи белков МЛУ: Mvp – продукта гена *MVP*, Bср1 – продукта гена *ABCG1*, Bср – продукта гена *ABCG2*, Mrp1 – продукта гена *ABCC1*, Mrp2 – белка гена *ABCC2* и Р-гликопротеина – продукта гена *ABCB1*. 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, Bср, Mrp1 и Р-гликопротеин, по сравнению с пациентами, у которых экспрессия мРНК генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ повышается (рисунок 4).

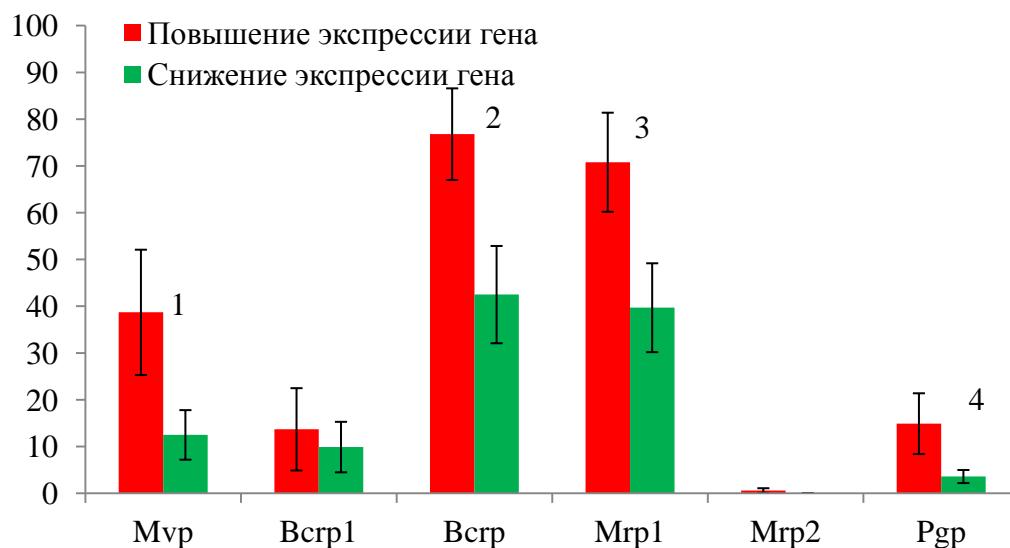


Рисунок 4. – Экспрессия белков химиорезистентности в опухоли молочной железы после НАХТ в зависимости от изменения экспрессии их генов. Примечание: уровень значимости по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни; 1 – $p = 0,035$; 2 – $p = 0,027$; 3 – $p = 0,039$; 4 – $p = 0,028$.

Полученные результаты еще раз подтверждают существование феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты, теперь уже на белковом уровне.

Экспрессия ABC-транспортеров и внутриопухоловая морфологическая гетерогенность. Показано, что инвазивно-протоковая карцинома молочной железы (80% от всех опухолей молочной железы) имеет высокую степень внутриопухоловой 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]. Пациенты с альвеолярными структурами в опухоли были менее чувствительны к НАХТ, у 143/231 (62%) этих больных, отсутствовал ответ на НАХТ, в то время как у больных без альвеолярных структур в опухоли только 70/151 (46%) ($p = 0,0028$) пациентов не отвечали на НАХТ. Также и больные с трабекулярными структурами в опухоли чаще показывали устойчивость к химиотерапии, по сравнению с пациентами без этих структур (59% против 45%; $p=0,0272$). Полученные результаты продемонстрировали, что внутриопухоловая морфологическая гетерогенность рака молочной железы, оказывает существенное влияние на эффективность неоадьюванной

химиотерапии. 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. Наличие тех или иных морфологических структур не оказывали существенного влияния на экспрессию генов ABC-транспортеров и ее изменение в процессе НАХТ. Не выявлены отличия по уровню экспрессии ABC-транспортеров и частоте повышения или снижения экспрессии генов ABC в зависимости от спектра указанных структур. Анализ экспрессии генов МЛУ в альвеолярных и трабекулярных структурах, вырезанных из опухоли при помощи лазерной микродиссекции, показали низкий уровень экспрессии генов ABC. 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*. Следовательно, одним из механизмов, обуславливающих химиорезистентность альвеолярных и трабекулярных структур, является низкая экспрессия гена *ABCB3*.

Метилирование промоторов генов ABC-транспортеров и их экспрессия в процессе НАХТ. Следующим изученным нами фактором, который предположительно мог бы определять экспрессию генов ABC-транспортеров, явилось метилирование промоторов изучаемых генов. Метилирование промоторных регионов генов является одним из основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов [Jones P.A., 2012]. Опухоли оказывается «выгодно» их гипометилирование и высокая активность экспрессии ABC-транспортеров, поскольку это помогает избегать повреждающего действия химиотерапии. 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. С использованием базы 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 (рисунок 5, больная Л1). При гиперметилировании промоторов генов *MVP* (больные К1 и Л2), *ABCG2* (больные К1 и К2) и *ABCB1* (больные К2 и Л2), 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. Данные метилчувствительной ПЦР для промотора *ABCB1*

были подтверждены при помощи бисульфитной конверсии и последующем секвенированием.

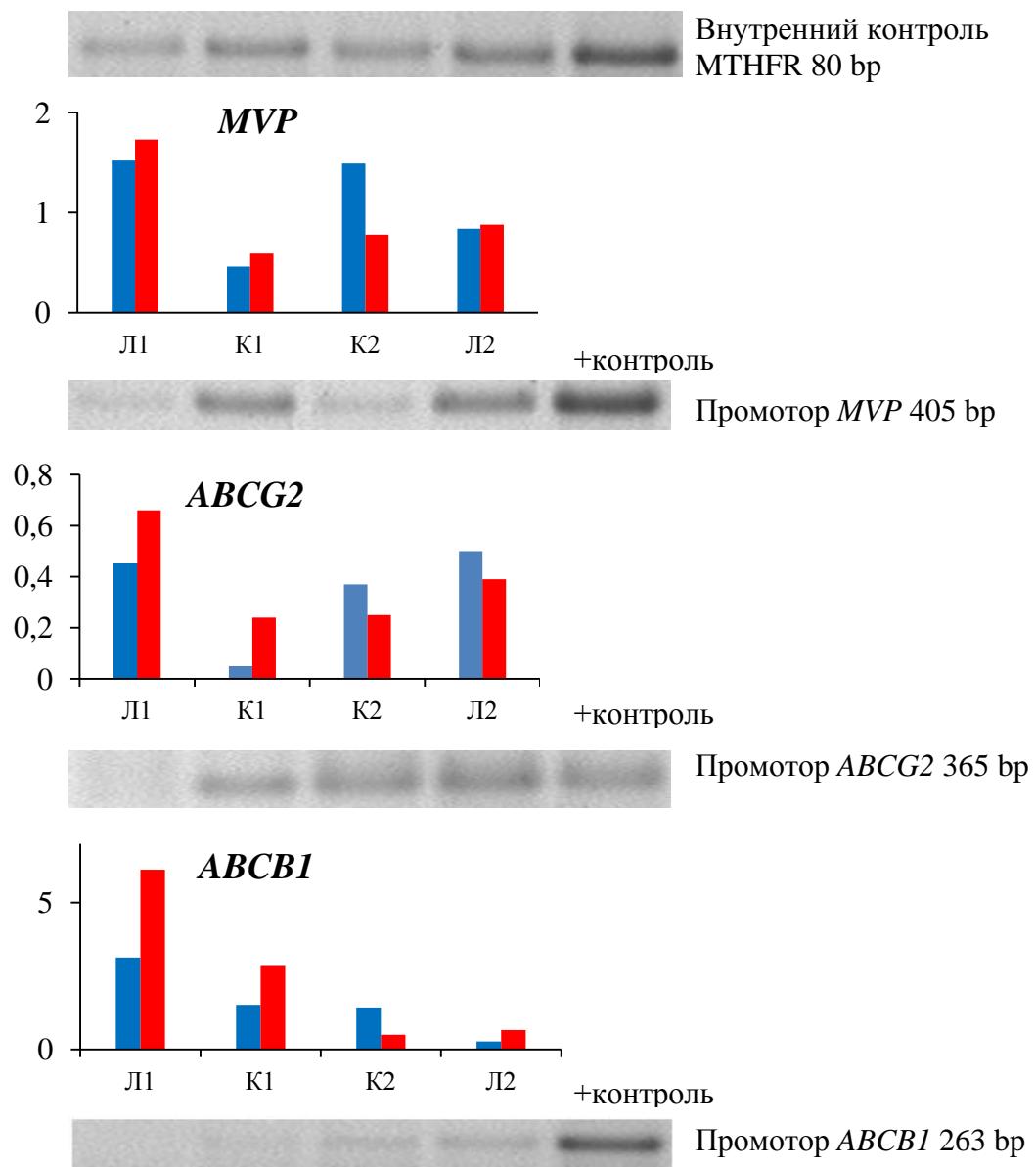


Рисунок 5 – Уровень экспрессии генов *MVP*, *ABCG2* и *ABCB1* в опухоли до лечения и после НАХТ и метилирование их промоторов в опухоли до лечения.

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 единицы). Метилирование промоторов генов оценивалось при помощи метил-чувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР) при использовании смеси метилчувствительных рестриктаз *Hpa*II ($C\downarrow CGG$) и *Hsp*aI ($CGC\downarrow G$) (Сибэнзим, Россия). *Msp*I (Fermentas, Termo Scientific) использовали на первом этапе в качестве контроля наличия CpG островков в участке амплификации. Результаты МЧ-ПЦР представлены в виде электрофорограммы для соответствующих больных. Отсутствие специфичного 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 *Hpa*II ($C\downarrow CGG$), *Hsp*aI ($CGC\downarrow G$) и *Msp*I.

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 уровня метилирования промоторов ABC-транспортеров у конкретного больного в процессе проведения химиотерапии в случае их гиперметилирования.

Ген-супрессор опухолевого роста *TP53* и экспрессия ABC-транспортеров в опухоли молочной железы. На следующем этапе была изучена роль гена *TP53* в регуляции экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Установлено, что 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.

Была определена связь одного экзонного (rs1042522) и двух инtronных (rs12602273 и rs8073498) полиморфизмов гена *TP53* с эффективностью НАХТ и экспрессией ABC-транспортеров. Rs12602273 и rs8073498 не показали значимой роли в регуляции экспрессии ABC-транспортеров и эффективности НАХТ. Напротив, функционально значимый экзонный полиморфизм *TP53 Arg72Pro* rs1042522 показал хорошую связь с эффектом НАХТ и экспрессией генов ABC.

Носители дикого *Arg/Arg* генотипа rs1042522 лучше 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 опухоли после НАХТ и со снижением экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP* в процессе НАХТ, в сравнении с гетерозиготным и минорным генотипами. У носителей *Arg/Arg* генотипа rs1042522 статистически значимо чаще наблюдается делеция локуса 17p13.1, в котором расположен ген *TP53* (в 27/41 - 65% случаев), чем у носителей *Arg/Pro+Pro/Pro* генотипов (12/29, 41% случаев). Делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* не влияет на уровень экспрессии ABC-транспортеров в опухоли до лечения и после НАХТ, однако связана с более частым снижением экспрессии генов ABC в процессе НАХТ, чем при нормальном состоянии локуса (таблица 2). Наконец, у больных с делецией 17p13.1 пятилетняя безметастатическая выживаемость значительно выше (85%), чем у больных с нормальным состоянием локуса 17p13.1 (55%) (log-rank test p = 0,024) (рисунок 6).

Возможным объяснением связи делеции локуса 17p13.1 гена *TP53* и негативной регуляции экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ может быть сохранение второго не делецированного аллеля в диком виде, в то время как при нормальном состоянии локуса 17p13.1, *TP53* должен быть инактивирован при помощи точковых мутаций.

Таблица 2. – 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 ($p < 0,1$).

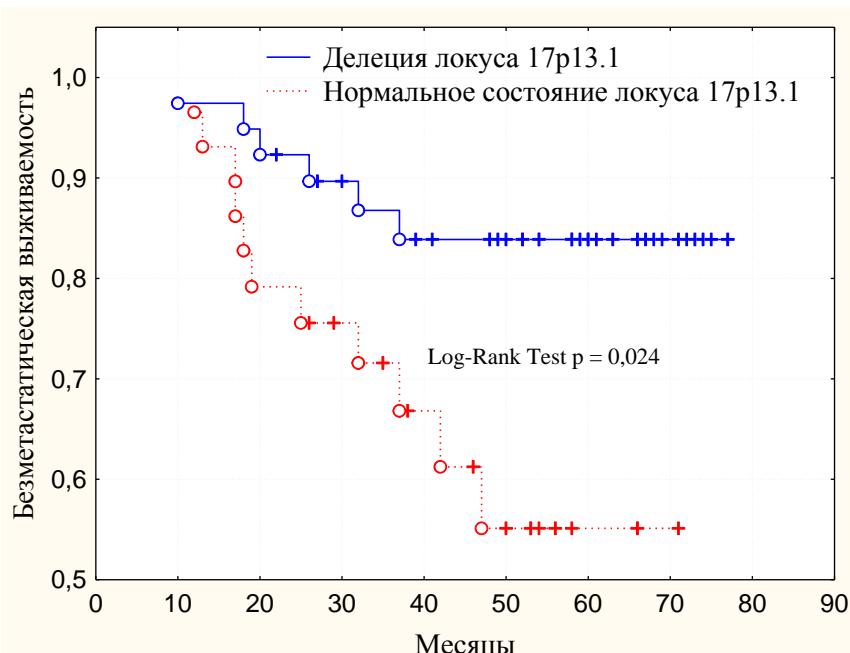


Рисунок 6. – Безметастатическая выживаемость больных раком молочной железы при делеции и нормальном состоянии локуса 17p13.1 гена *TP53*.

Таким образом, экзонный полиморфизм *TP53 Arg72Pro rs1042522* и делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* оказывают влияние на процессы негативной регуляции экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Делеция локуса 17p13.1 гена *TP53* является благоприятным прогностическим признаком, за счет влияния на экспрессию генов ABC.

Хромосомные аберрации в опухолевой ДНК и экспрессия ABC-транспортеров в процессе НАХТ. Далее мы проверили основную гипотезу (предположение) о том, что причиной снижения экспрессии ABC-транспортеров под действием химиопрепараторов являются многочисленные аберрации (и прежде всего, хромосомные), которые характерны для солидных опухолей [Gordon D.J., et al., 2012, McGranahan N., et al., 2012], и, возможно, нарушают механизмы активации ABC-транспортеров. Была изучена роль структурных хромосомных аномалий в регуляции экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в процессе НАХТ. Делеции или амплификации хромосомных регионов и отдельных хромосом называют аберрациями числа копий ДНК (CNA – copy number aberration). Для исследования использовалась микроматрица высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, позволяющая «видеть» одновременно весь спектр мутантных опухолевых клонов. С помощью микроматриц было исследована ДНК 68 пациентов, полученная из биопсийных образцов опухоли до лечения.

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 локусов, в которых они локализованы, и частота объективного ответа на НАХТ при делециях локусов генов ABC. Установлено, что в подавляющем большинстве случаев (75%-100%) при делеции локуса гена ABC его экспрессии снижается в процессе химиотерапии (уровень экспрессии гена в пост-НАХТ образцах опухоли ниже по сравнению с парными пре-НАХТ образцами) (таблица 3).

Таблица 3. – 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 при делеции локуса гена ABC	Частота 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%

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 нее не различался. Однако делеция локуса гена ABC влияет на формирование адаптивной экспрессии гена – после НАХТ уровень экспрессии делецированного гена был ниже, чем у больных с нормальным состоянием локуса. Статистически значимые различия достигнуты для генов *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2*. После проведения НАХТ уровень экспрессии в образцах при делеции локуса в 2,5-7,5 раз ниже, чем в образцах без делеции (таблица 4).

У 9-49% пациентов со снижением экспрессии того или иного 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% (таблица 3).

Таблица 4. – Уровень экспрессии ABC-транспортеров до лечения и после НАХТ у больных с нормальным состоянием или 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.

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 на НАХТ отмечен у 62% – 88% пациентов с делециями локусов генов *ABCC1* (16p13.1), *ABCC2* (10q24), *ABCG1* (21q22.3) и *ABCG2* (4q22.1) (таблица 3). Это предполагает возможность использования делеций локусов генов ABC 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-й больной из 22 (5%) 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 (33%) больных (log-rank test $p = 0,008$), т.е. наличие в опухоли делеции локусов этих генов является благоприятным прогностическим фактором (рисунок 7).

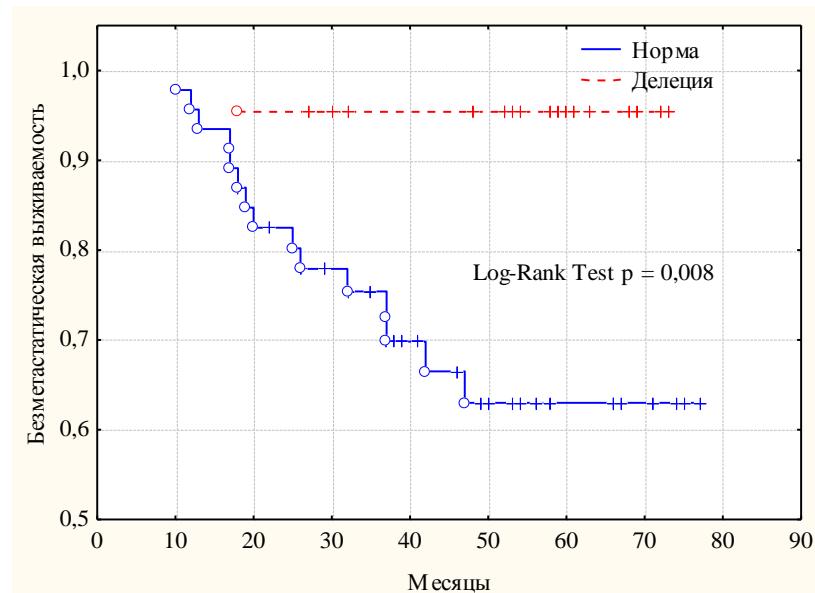


Рисунок 7. – Безметастатическая выживаемость у больных с делецией хотя бы одного из локусов генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCG2* и *MVP*

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 указанных генов ($n = 34$). 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, при отсутствии делеции – только у 9% пациентов (рисунок 8). По критерию Фишера различия между этими 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 *RB1*. С одной стороны, делеция *RB1* может быть одной из причин нарушения механизмов системы активации ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты, с другой стороны, теоретически возможна реализация механизма непосредственной негативной регуляции экспрессии ABC-транспортеров через деацетилазу гистонов *HDAC1* и *RB1*.

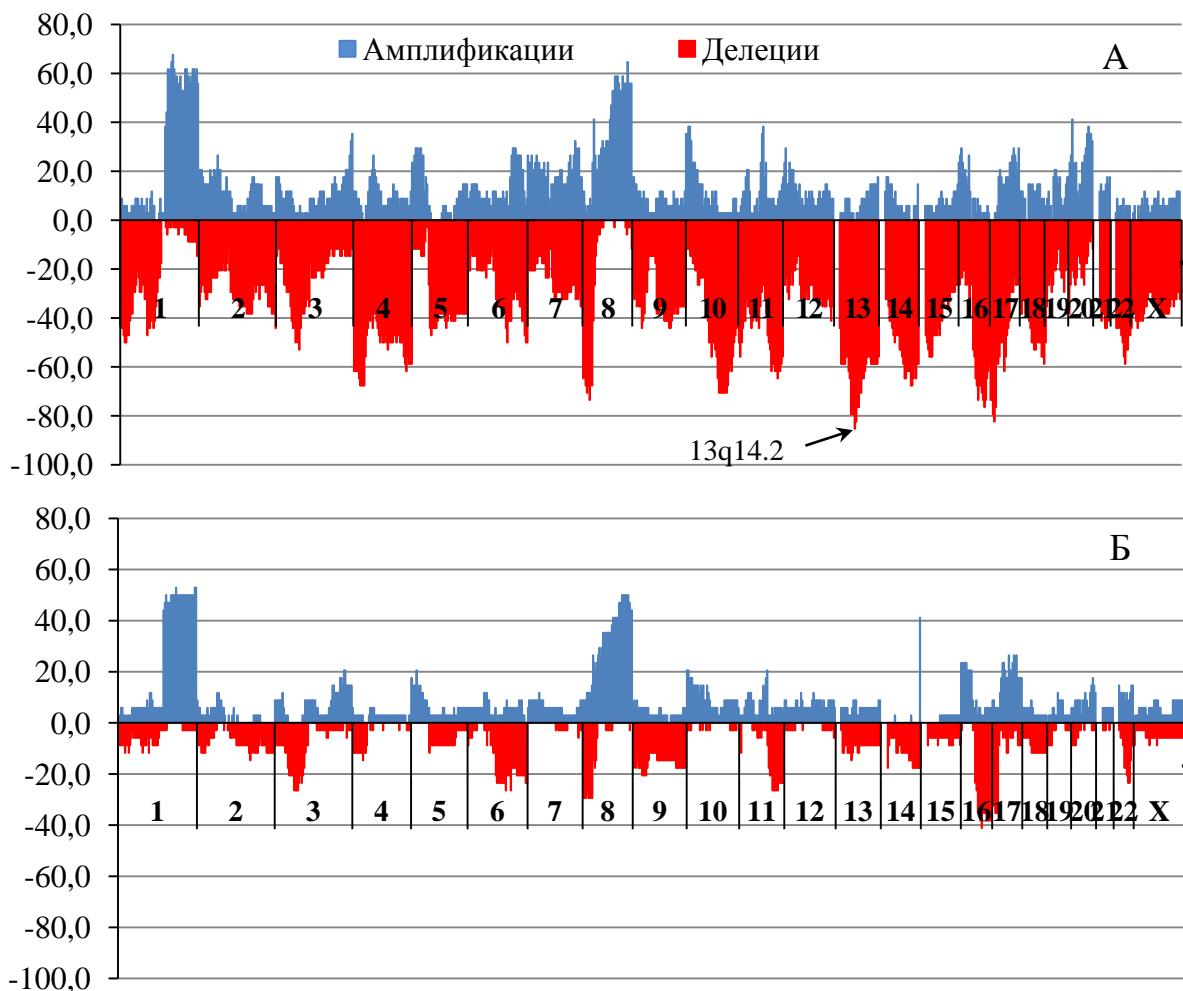


Рисунок 8. – Частота аберраций числа копий ДНК в группах больных делецией локусов генов ABC-транспортеров (А) и без делеции локусов генов ABC-транспортеров (Б).

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

Далее были идентифицированы хромосомные локусы, связанные с регуляцией экспрессии каждого ABC-транспортера в отдельности (таблица 5 желтый цвет). Амплификация локуса 1q32.2 длинного плеча 1 хромосомы и делеция локуса 11q22.3 ассоциированы со снижением экспрессии гена *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG2* в процессе НАХТ, а нормальное состояние локуса – с повышением экспрессии этих генов. По-видимому, 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 делеций этих механизмов приводит, в конечном счете, к снижению уровня экспрессии генов в образцах опухоли, полученных после химиотерапии. Вторым регуляторным регионом следует признать локус 1q23.3, амплификации этого

локуса с наибольшей частотой встречаются при снижении экспрессии генов *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC5* и *MVP* (таблица 5 лиловый цвет).

Таблица 5. – 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.

Интересным результатом проведенного анализа явилась идентификация общего для всех изученных генов ABC локуса 17q13.1, делеции которого с наибольшей частотой (в 63-74% случаев) встречались при снижении экспрессии этих генов в процессе НАХТ (рисунок 5 голубой цвет). 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 делеции ассоциированы с негативной регуляцией генов ABC.

Очень важным моментом является то, что со снижением экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ сопряжены CNA, а не нормальное состояние локусов. Это еще раз подтверждает мысль о том, что снижение экспрессии ABC-транспортеров все-таки является aberrантным 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, а не к повышению экспрессии под

действием химиопрепаратов, как это происходит при сохранении нормальных механизмов регуляции.

Хромосомные аномалии показывают только ассоциацию со снижением экспрессии ABC-транспортеров в процессе НАХТ, но не объясняют механизма снижения. Для прояснения этого вопроса мы изучили, что происходит с мутантными опухолевыми клонами в процессе НАХТ, как клональная эволюция опухоли под действием химиопрепаратов участвует в реализации феномена снижения экспрессии ABC-транспортеров.

Клональная эволюция опухоли в процессе НАХТ и изменение экспрессии ABC-транспортеров. При воздействии на опухоль химиопрепаратов происходят эволюционные изменения мутантных опухолевых клонов. При этом может происходить их частичная или полная элиминация, образование новых клонов, экспансия минорных клонов, которые могут приобретать доминирующее положение в опухоли заселяя освободившиеся место после гибели отдельных клонов.

Различные опухолевые клоны РМЖ характеризуются специфическими структурными и числовыми хромосомными аберрациями, которые образовались в результате клональной эволюции в процессе канцерогенеза [Navin N., et al., 2011, Ng C.K., et al., 2012]. Все их одновременно можно видеть при помощи микроматрицы CytoScan HD Array (Affymetrix, USA). Кроме этого, можно производить и количественный анализ статуса числа копий (CNstate) каждой мозаичной хромосомной аберрации, которая фактически говорит о представленности (в %) мутантного клона с данной аномалией на фоне нормальной ДНК опухолевой стромы и других мутантных клонов, без данной аномалии. Если знать CNstate каждой мозаичной хромосомной мутации, то можно определить число опухолевых мутантных клонов в конкретной опухоли, а суммарный CNstate всех мозаичных мутаций отражает соотношение опухолевой паренхимы и стромы в опухолевой ткани молочной железы.

Для исследования клональной эволюции опухоли в процессе НАХТ из числа пациентов случайным образом были отобраны 26 больных, у которых микроматричный анализ был проведен не только в образцах биопсии опухоли до лечения, но и в операционном материале после проведения НАХТ. Установлено, что в большинстве случаев изменение частоты СНА, 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 генетической эффективности НАХТ. В отличие от объема опухоли, изменение частоты СНА, 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 в процессе НАХТ числа мутантных клонов (на рисунке 9 показано появление новых мутантных опухолевых клонов у конкретной больной в процессе НАХТ) у 5 из 6 (83%) пациенток наблюдались

метастазы. При уменьшении числа мутантных клонов или отсутствии генетического ответа опухоли на НАХТ (опухолевые клоны не меняются), наблюдается 100% выживаемость (Log-Rank Test $p=0,00001$) (рисунок 10).

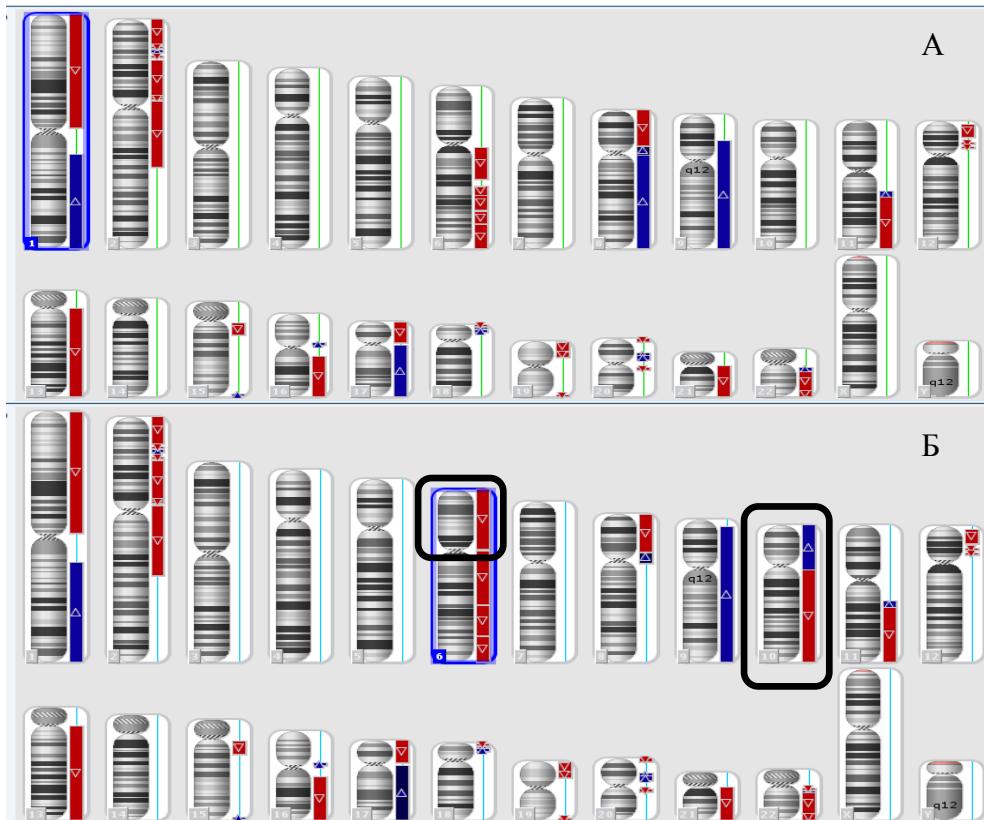


Рисунок 9. – Хромосомные аномалии в опухоли больной Б3 до лечения (А) и после НАХТ (Б). Выделено появление новых аномалий в коротком плече 6 хромосомы и в 10 хромосоме.

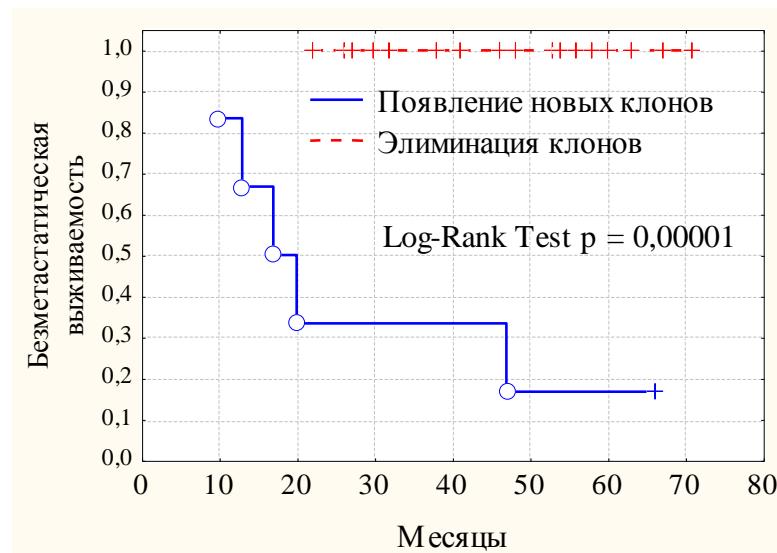


Рисунок 10. – Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от появления или элиминации мутантных опухолевых клонов в процессе НАХТ.

Мы предполагаем, что размножившиеся или образовавшиеся *de novo* в процессе НАХТ мутантные опухолевые клоны и являются теми клонами, которые выходят в кровеносное русло и осуществляют отдаленное метастазирование. Этот

вопрос требует анализа, выходящего 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 пролиферации минорных резистентных к химиотерапии субпопуляций и/или дальнейшей клональной эволюции, приводящей к образованию новых мутантных опухолевых клонов и 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 (таблица 6).

Таблица 6. – 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 повышение экспрессии/снижение 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

Был также проведен и обратный анализ зависимости изменений частоты амплификаций, делеций, CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов от изменения экспрессии генов ABC-транспортеров в процессе НАХТ (таблица 7).

Таблица 7. – 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 повышение экспрессии/уменьшение 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

Установлено, что в 56-80% случаев при уменьшении под действием химиопрепараторов частоты амплификаций (но не делеций), CNA, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов, наблюдается снижение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2*. 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 химиопрепараторов, которая выражается в сокращении мутантной ДНК.

Установлено, что элиминация опухолевых клонов и делеция локусов ABC-транспортеров являются независимыми механизмами, которые могут приводить к снижению экспрессии генов ABC самостоятельно. Из всех 26 обследованных только у больной Н1 отсутствуют изменения в процессе НАХТ частоты амплификаций, делеций, СНА, опухолевой паренхимы и числа мутантных клонов в процессе НАХТ (рисунок 11 А и Б). Кроме того, у этой больной нет делеций исследованных генов ABC-транспортеров, а локусы практически всех генов ABC амплифицированы, тем не менее экспрессия всех генов лекарственной устойчивости (за исключением *ABCC1*) в процессе НАХТ снижается (рисунок 11 В).

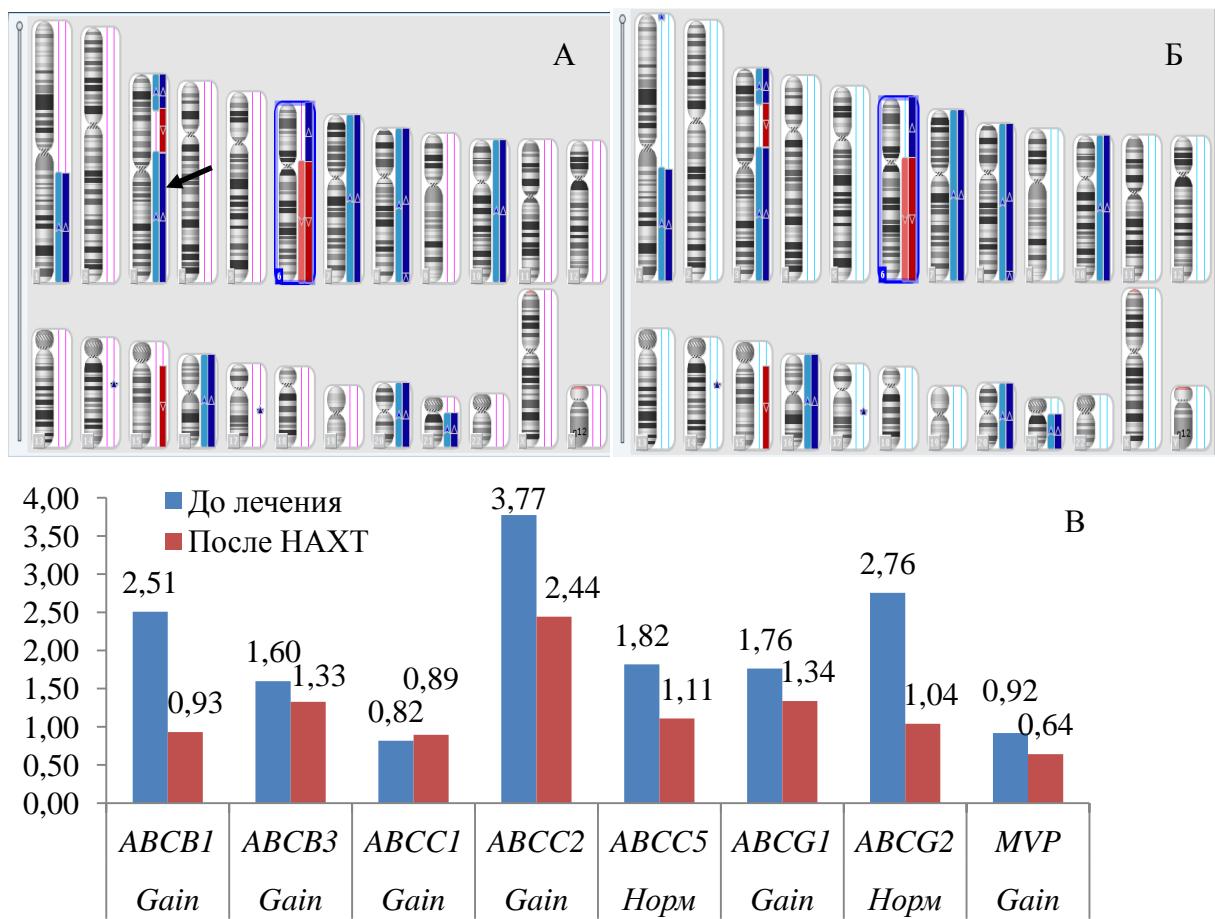


Рисунок 11. – Хромосомные аберрации и экспрессия генов МЛУ у больной Н1 до лечения и после НАХТ. До лечения (А) после НАХТ (Б) - хромосомные аберрации (синим цветом – амплификации, красным – делеции) в опухоли больной Н1; В – экспрессия генов МЛУ до лечения и после НАХТ и состояние их локусов. Больная Н1: Т₂Н₂М₀, трижды-негативный тип, Эффект НАХТ – частичная регрессия 57%, 2 степень патоморфоза, схема НАХТ – FAC 4 курса, метастазов нет, общая выживаемость -74 месяца

Это наблюдение является уникальным и со всей ясностью свидетельствует о том, что, независимо от элиминации опухолевых клонов и делеций локусов генов ABC, существует еще один самостоятельный механизм, связанный со снижением экспрессии генов лекарственной устойчивости, который реализуется 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 ли их у других обследованных больных. Оказалось, что единственным уникальным локусом, которой амплифицирован только у больной Н1, является цитобэнд 3р12.3 (на рисунке 11 отмечен стрелкой), в котором локализован ген *DAP4C* (death-associated protein 4C), усиливающий *MST1*(macrophage stimulating 1)-индуцированный апоптоз и стабилизирующий p53, который является негативным регулятором экспрессии ABC-транспортеров.

В процессе химиотерапии, если происходит элиминация мутантных опухолевых клонов, элиминируются, прежде всего клоны, которые несут делеции генов ABC и хромосомные нарушения, представленные в таблице 5. На рисунке 12 показана элиминация в процессе НАХТ опухолевых клонов, несущих делеции локусов генов ABC и нарушения

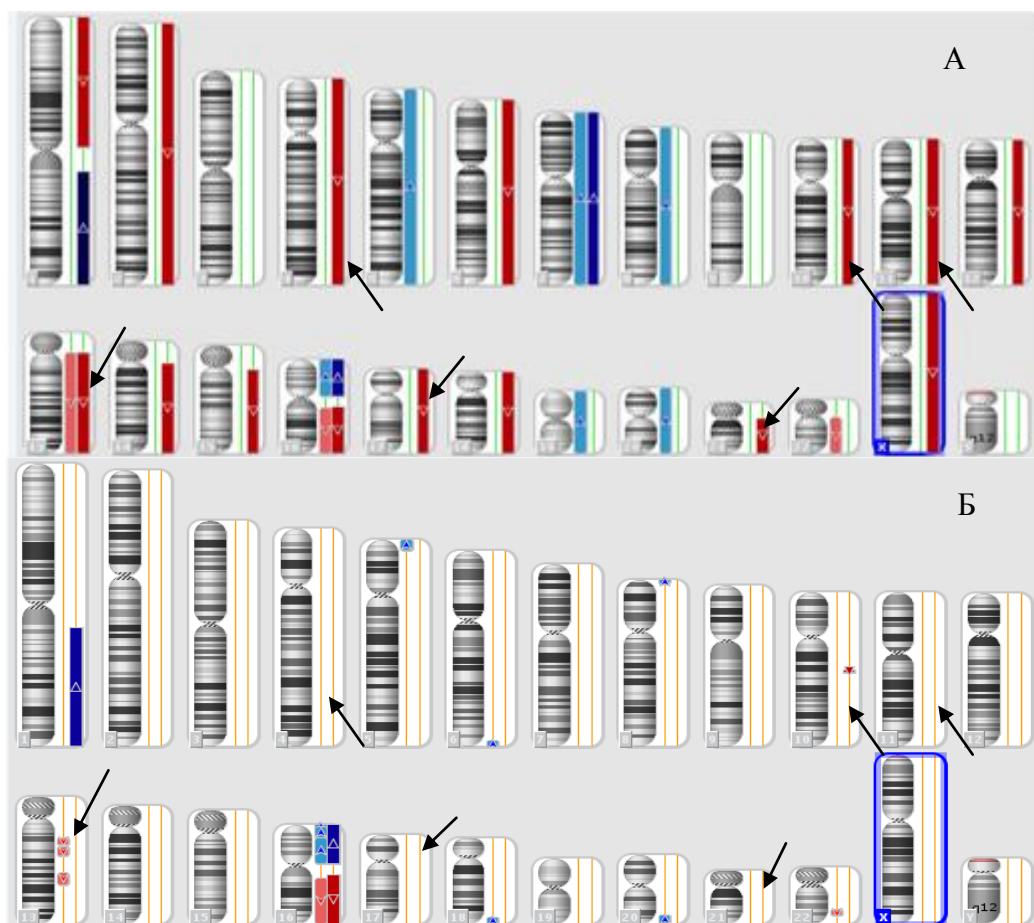


Рисунок 12. – Элиминация в процессе НАХТ у больной Р2 мутантных опухолевых клонов несущих делеции локусов генов ABC (*ABCG2*-4q22.1, *ABCC2*-10q24, *ABCG1*-21q22.3) и хромосомные нарушения механизмов up-регуляции генов ABC (del 11q22.3, del 13q14.2, del 17p13.1). А – до лечения, Б – после НАХТ

Таким образом, установлено, что низкий уровень экспрессии генов ABC в опухоли до лечения не является причиной для элиминации опухолевых клонов в процессе НАХТ. Получены данные, свидетельствующие о тесном взаимодействии фактора изменения экспрессии генов ABC в процессе НАХТ и изменения опухолевых мутантных клонов под действием химиопрепараторов. На рисунке 13 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 химиотерапию. В зависимости от состояния первичной опухоли события в процессе НАХТ может развиваться по трем возможным сценариям.

1. Примерно в 40% первичных опухолей, благодаря небольшому количеству повреждений за счет несбалансированных хромосомных аномалий, сохраняются основные механизмы ир-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.

2. Примерно у 57% опухолей еще до начала лечения в клетках, наблюдается высокая частота несбалансированных хромосомных аномалий, которые приводят к значительным нарушениям в механизмах ир-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 амплификации 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 и amp 1q23.3, amp 1q32.2, amp 1q44, del 11q22.3, del 13q14.2 не сохраняются после НАХТ и элиминируются. Это приводит к выводу о том, что в начале курсов химиотерапии уничтожаются чувствительные опухолевые клоны с нарушениями ир-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. Была показана низкая экспрессия генов ABC в строме, по сравнению с опухолевой тканью, учитывая это, уменьшение паренхиматозно-стромального соотношения будет приводить к 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 ир-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 ир-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 ингибирировать продукты генов ABC-транспортеров, а надо нарушить механизмы ир-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, и конвенциональных лекарственных средств, которые и будут оказывать основное противоопухолевое действие в условиях нарушения за счет таргетных препаратов механизмов ир-регуляции экспрессии ABC-транспортеров и формирования адаптивной МЛУ. Это может стать новой стратегией управления множественной лекарственной устойчивостью опухоли.

3. Истинное снижение экспрессии генов ABC-транспортеров в опухолевых клетках в процессе НАХТ, который наблюдается в 3% опухолей. Не изменяется частота СНА, опухолевая паренхима и число мутантных клонов. Отсутствуют делеции локусов ABC-транспортеров определяется наличием уникальной хромосомной аномалии – амплификации региона 3р12.3, в котором среди прочих генов локализован *DAP4*, усиливающий *MST1*-индукция апоптоз и стабилизирующий p53, являющийся негативным регулятором экспрессии ABC-транспортеров. Однако этот механизм нуждается в экспериментальной проверке. Еще одним дополнительным фактором, который может определять истинное снижение экспрессии ABC-транспортеров, может служить 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.

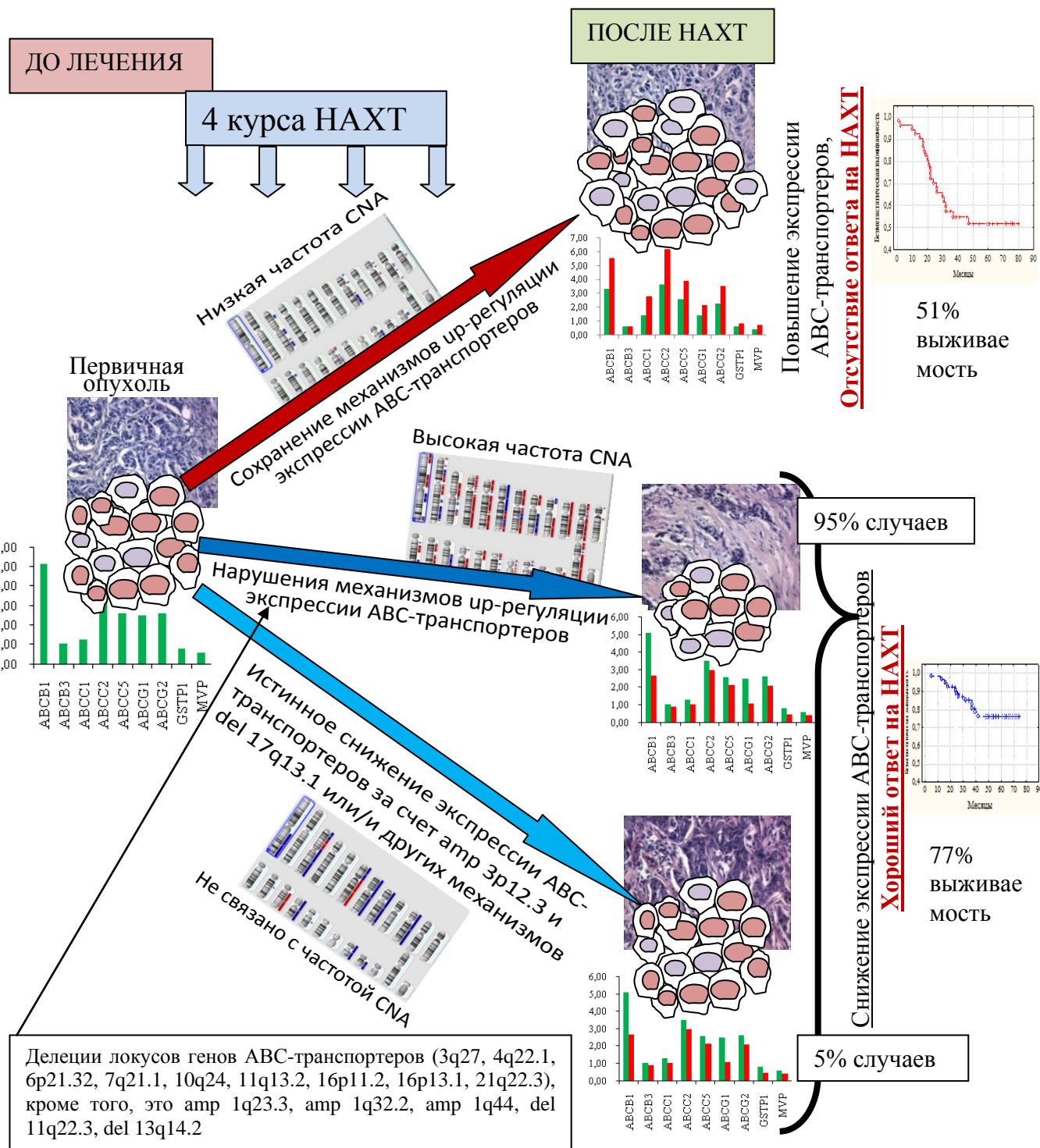


Рисунок 13. – ABC-транспортеры: регуляции и клиническая значимость.

1-сценарий: В клетках первичной опухоли низкая частота СНА, сохраняются механизмы up-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-сценарий: 95% случаев снижения экспрессии генов ABC. В клетках первичной опухоли большое количество СНА, нарушены механизмы up-регуляции экспрессии ABC-транспортеров в ответ на химиопрепараты за счет несбалансированных хромосомных аномалий (СНА). 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-сценарий: 5% случаев снижения экспрессии генов ABC. В опухолевых клетках амплификация 3р12.3 и 17р13.1. В процессе НАХТ опухолевые клетки не элиминируются, число мутантных клонов не изменяется, происходит истинное снижение экспрессии генов ABC в опухолевых клетках.

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 обусловливает 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 химиопрепараторов, 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 химиопрепараторов в условиях клинической опухоли, который не определяется естественной нормализацией экспрессии после окончания воздействия.
5. У больных со снижением экспрессии мРНК генов *MVP*, *ABCG2*, *ABCC1* и *ABCB1* в опухоли молочной железы выявлен низкий уровень опухолевых клеток в операционном материале, экспрессирующих кодируемые этими генами белки: Mvp, Встр, 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/или 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 показана высокая экспрессия этих генов и повышение в процессе НАХТ. Гиперметилирование промоторов генов МЛУ приводит к низкой экспрессии генов ABC в опухоли до лечения, но не оказывает существенного влияния на изменение экспрессии этих генов при проведении НАХТ и не определяет снижение экспрессии генов с гиперметилированными промоторами в процессе НАХТ. По существу, уровень метилирования промоторных областей ABC-транспортеров обуславливает только исходный уровень их экспрессии в опухоли до лечения, который формирует предсуществующую МЛУ.

8. Полиморфизм в кодирующем регионе гена опухолевой супрессии *TP53+119C>G Arg72Pro rs1042522* связан с эффектом НАХТ и экспрессией генов ABC-транспортеров. Носители *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 гетерозиготным 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 ABC, $p = 2.03 \times 10^{-11}$, 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 изученного 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 аберрантным 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 мутантных опухолевых клонов наблюдается снижение экспрессии генов *ABCB1*, *ABCB3*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2* и наоборот, при снижении экспрессии в 73-85% случаев отмечается элиминация мутантных 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 ABC 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.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Литвяков Н.В. Множественная лекарственная устойчивость. Механизмы возникновения и молекулярные маркеры.//Сибирский онкологический журнал.- 2005.- №4.- С. 64-65.
2. Денисов Е.В., Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Статус гена p53 при раке молочной железы: взаимосвязь мутаций и полиморфизма 72 кодона // Материалы III международной конференции «Фундаментальные науки - медицине». – Новосибирск, 2007. – С.23.
3. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Пономарева А.А., Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Молекулярно-генетические подходы в предсказании эффективности неоадъювантной химиотерапии при раке молочной железы. // Вопросы онкологии.- 2008.-№2 приложение.- Т.54 М.54.- тезисы 4-й Российской конференции по фундаментальной онкологии «Петровские чтения – 2008».– С.-Петербург, 18 апреля 2008.- С.16-17.
4. Перельмутер В.М., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Крицкая Н.Г., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Бабышкина Н.Н., Малиновская Е.А., Денисов Е.В., Лебедев И.Н., Назаренко М.С, Сенников С. В., Горева Е.П., Козлов В.А., Воевода М.И., Максимов В.Н., Беляевская В.А., Чердынцева Н.В. Генетические и клинико-патологические особенности рака молочной железы у больных с сохраненной менструальной функцией и в менопаузе// Успехи геронтологии – 2008.-Т. 21, № 3.– С.443-453 (IF-0,363).
5. Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Бабышкина Н.Н., Стегний В.Н., Чердынцева Н.В. Мутации в ген-супрессоре TP53 и их связь с особенностями клинического течения рака молочной железы. // Сибирский онкологический журнал.- 2008.-№2.- С.32-36 (IF-0,410).
6. Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Вторушин С.В., Стахеева М.Н., Савенкова О.В., Крицкая Н.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Взаимосвязь чувствительности опухоли к неоадъювантной химиотерапии с морфологическим строением первичного опухолевого узла при уницентрическом инфильтрирующем протоковом раке молочной железы. // Сибирский онкологический журнал.- 2008.-№6. – С.30-34 (IF-0,410).
7. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Пономарева А.А., Завьялова М.В., Перельмутер В.М., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Взаимосвязь с эффективностью НАХТ экспрессии генов лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы.// Материалы российской научно-практической конференции «Современные аспекты диагностики и лечения рака молочной железы». – Томск, 2008. – Сибирский онкологический журнал, Приложение 2 – С.56-58.
8. Цыганов М.М., Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Мерзлякова М.К. Взаимосвязь экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли

молочной железы с эффективностью неоадъювантной химиотерапии.//Сибирский онкологический журнал 2009 приложение №1 стр. 211-212

9. Litvyakov N.V., Garbukov E.Yu., Babyshkina N.N., Tsyganov M.M., Merzlyakova M.V., Zav'ialova M.V., Perel'muter V.M., Slonimskaya E.M., Cherdynseva N.V. Relationship of Expression of Multidrug Resistance Genes in Tumor Tissues From Breast Cancer Patients with the Neoadjuvant Chemotherapy Efficacy.// Tomsk Region and Taiwan: Experience of Scientific-Technical and Innovation Cooperation Volume 2 Experience and prospects for cooperation between Russian and Taiwanese scientists in the field of studying molecular-genetic mechanisms of cancer development and applying results of basic studies in oncology. Forum Proceedings 16–17 September, 2009 Tomsk.- P.116-118.

10. Denisov E.V., Cherdynseva N.V., Litviakov N.V., Malinovskaya E.A., Voevoda M.I., Belyavskaya V.A., Stegniy V.N. TP53 mutations and Arg72Pro polymorphism in breast cancer patients' tumors // Cancer Genetics and Cytogenetics. – 2009. – Vol.192. – P.93-95 (IF-1,929).

11. Гервас П.А., Литвяков Н.В., Стакеева М.Н., Миллер С.В., Добродеев А.Ю., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Кухарев Я.В., Васильева М.В., Слонимская Е.М., Белявская В.А., Тузиков С.А., Чердынцева Н.В. Влияние полиморфизма генов апоптоза и репарации на эффективность неоадъювантной химиотерапии злокачественных новообразований.// Сибирский онкологический журнал.- №4.- 2009.- С.41-47 (IF-0,410).

12. Цыганов М.М., Гарбуков Е.Ю., Мерзлякова М.К., Халюзова М.В., Волкоморов В.В., Литвяков Н.В. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и маркеров химиочувствительности в опухоли молочной железы до и после неоадъювантной химиотерапии. // Сибирский онкологический журнал.- 2010.- Приложение 1.- С.107-108.

13. Волкоморов В.В., Гарбуков Е.Ю., Мерзлякова М.К. Цыганов М.М., Халюзова М.В., Литвяков Н.В. Взаимосвязь экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости с полиморфизмом генов МЛУ и цитокинов. // Сибирский онкологический журнал.- 2010.- Приложение 1.- С.30-31.

14. Cherdynseva N.V., Denisov E.V., Gervas P.A., Litvyakov N.V., Slonimskay E.M., Perelmutter V.M., Choinzonov. E.L. Age related function of tumor suppressor gene TP53: contribution to cancer risk and progression //Experimental oncology. - 2010. - Том Vol. 32 , N Sup. - P. 24. - International conference Tumor and host: novel aspects of old problem. Kiev, 21-24 september

15. Литвяков Н.В., Денисов Е.В., Гарбуков Е.Ю., Цыганов М.М., Волкоморов В.В., Мерзлякова М.К., Халюзова М.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Экспрессия генов резистентности и маркеров химиочувствительности в опухоли молочной железы в процессе неоадъювантной химиотерапии.//Материалы XVI Российского онкологического конгресса Москва 23-25 ноября 2010.-С.100.

16. Литвяков Н.В., Денисов Е.В., Гарбуков Е.Ю., Цыганов М.М., Мерзлякова М.К., Волкоморов В.В., Халюзова М.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Экспрессия генов резистентности и маркеров химиочувствительности в опухоли молочной железы в процессе неоадъювантной химиотерапии. // Медицинская

генетика (Тезисы VI съезда Российского общества медицинских генетиков г. Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010 г.,) - С.104.

17. 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., Sevost'janova N.V., Koshel A.P. Association Between TP53 Gene ARG72PRO Polymorphism and Chromosome Aberrations in Human Cancers.// Molecular Carcinogenesis 2010.- 49:521– 524.- P.521-524 (IF-4,770).
18. Cherdynseva N.V., Gervas P.A., Litvyakov N.V., Stakcheeva M.N., Ponomareva A.A., Dobrodeev A.Yu., Denisov E.V., Belyavskaya V.A., Choinzonov E.L. Age-related function of tumor suppressor gene TP53: contribution to cancer risk and progression.//Experimental oncology. 2010. – Vol. 32., Spl. – P.205 – 208 (IF-1,110).
19. Zavyalova M, Perelmuter V, Vtorushin S, Denisov E, Litviakov N, Slonimskaya E, Cherdynseva N The breast tumor morphological heterogeneity and cancer progression//3rd Norwegian Cancer Symposium “Growth and Proliferation: Molecular Regulators of Cancer”.-2011.-P.46
20. Денисов Е.В., Цыганов М.М., Таширева Л.А., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Чердынцева Н.В., Перельмутер В.М. Экспрессионная гетерогенность морфологических структур и их стромального микроокружения в опухолевой ткани молочной железы // Тезисы докладов Международной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 5-9 сентября 2011 г., Томск. С. 58-60.
21. Литвяков Н.В., Денисов Е.В., Гарбуков Е.Ю. Цыганов М.М., Волкоморов В.В., Мерзлякова М.К., Вторушин С.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В., Экспрессия генов резистентности и маркеров химиочувствительности в опухоли молочной железы в процессе неoadъювантной химиотерапии. Сборник статей: Молекулярные и биологические технологии в медицинской практике.- «Офсет», Новосибирск.- 2011.- Вып.16.- С.69-74.
22. Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Цыганов М.М., Гарбуков Е.Ю., Мерзлякова М.К., Волкоморов В.В., Вторушин С.В, Завьялова М.В., Слонимская Е.М. Гены лекарственной устойчивости и химиотерапия при раке молочной железы. //Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Научно-практические аспекты модернизации онкологической службы регионального уровня». -2012.- Красноярск 24-25 мая 2012 г. С.108-117.
23. Denisov E.V., Sukhanovskaya T.V., Dultseva T.S., Malinovskaya E.A., Litviakov N.V., Slonimskaya E.M., Choinzonov E.L., Cherdynseva N.V. Coordination of TP53 Abnormalities in Breast Cancer: Data from Analysis of TP53 Polymorphisms, Loss of Heterozygosity, Methylation, and Mutations // Genetic Testing and Molecular Biomarkers. December 2011, 15(12): 901-907. doi:10.1089/gtmb.2011.0038 (IF-1,444).
24. Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Цыганов М.М., Денисов Е.В., Мерзлякова М.К., Гарбуков Е.Ю., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Слонимская Е.М. Ассоциация генетического полиморфизма с изменением экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли

молочной железы в процессе неоадъювантной химиотерапии.//**Медицинская генетика.**- 2011.- №10.- С.37-43 (IF-0,368).

25. Чердынцева Н.В., Иванова Ф.Г., Литвяков Н.В., Кухарев Я.В., Малиновская Е.А. Молекулярно-генетические особенности прогрессии и ответа на терапию злокачественных новообразований: этнические аспекты.//**Медицинская генетика.**- 2011.- №10.- С.28-36 (IF-0,368).

26. Litviakov N.V., Cherdynseva N.V., Tsyganov M.M., Garbukov E.Yu., Slonimskaya E.M. Alteration in expression of MDR genes in breast carcinoma patients following preoperative chemotherapy is related with clinical response.// Седьмой съезд онкологов и радиологов стран СНГ / Казахский НИИ онкологии и радиологии. - Астана , 2012. -С. 424

27. Cherdynseva N.V., Denisov E.V., Litviakov N.V., Maksimov V.N., Malinovskaya E.A., Babyshkina N.N., Slonimskaya E.M., Voevoda M.I., Choinzonov E.L. Crosstalk Between the FGFR2 and TP53 Genes in Breast Cancer: Data from an Association Study and Epistatic Interaction Analysis. //**DNA and Cell Biology** 2012, 31(3):305-315. doi:310.1089/dna (IF-2,344).

28. Цыганов М.М., Гарбуков Е.Ю., Литвяков Н.В. Изменение экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы в процессе предоперационной химиотерапии и безметастатическая выживаемость. //Сибирский онкологический журнал.- 2013.- Приложение 1.- С.92-93.

29. Цыганов М.М., Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Завьялова М.В., Литвяков Н.В. Внутриопухолевая морфологическая гетерогенность рака молочной железы: экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости и эффективность неоадъювантной химиотерапии. //Сибирский онкологический журнал.- 2013.- Приложение 1.- С.93-94.

30. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Денисов Е.В., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В. Вектор изменения экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неоадъювантной химиотерапии и безметастатическая выживаемость.// Вопросы онкологии. - 2013. - Том 59, N Прил. к № 3, том 1. - С. 93-94. – Материалы VIII съезда онкологов России, С.-Петербург, 11-13 сентября 2013 г.

31. Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Денисов Е.В., Гарбуков Е.Ю., Христенко К.Ю., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Градиент экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении предоперационной химиотерапии: клиническая значимость и регуляция.// Вопросы онкологии. - 2013. - Том 59, N Прил. к № 3, том 1. - С. 94-95. – Материалы VIII съезда онкологов России, С.-Петербург, 11-13 сентября 2013 г.

32. Zavyalova M.V., Perelmutter V.M., Vtorushin S.V., Denisov E.V., Litvyakov N.V., Slonimskaya E.M., Cherdynseva N.V. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis.// **Diagnostic Cytopathology.** 2013 Mar;41(3):279-82. doi: 10.1002/dc.21852 (IF-1,520).

33. Litviakov N.V., Cherdynseva 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, Vol.71 N.1 P.153-163 (IF-2,795).
34. Zavyalova M.V., Denisov E.V., Tashireva L.A., Geraschenko T.S., Litviakov N.V., Skryabin N.A., Vtorushin S.V., Telegina N.S., Slonimskaya E.M., Cherdynseva N.V., Perelmuter V.M. Phenotypic Drift as a Cause for Intratumoral Morphological Heterogeneity of Invasive Ductal Breast Carcinoma Not Otherwise Specified.//BioResearch Open Access.- 2013-Apr;2(2):148-54.- Doi:10.1089/biores.2012.0278 (IF-no)
35. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Денисов Е.В. Основные достижения в фундаментальной онкологии в 2012 году.// Практическая онкология.- 2013.- Т.14.- №1.- С.1-12 (IF-1,031).
36. Кухарев Я.В., Стакеева М.Н., Дорошенко А.В., Литвяков Н.В., Бабышкина Н.Н., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В. Связь иммунологических показателей с эффективностью неоадьювантной химиотерапии у больных раком молочной железы//Сибирский онкологический журнал.- 2013.- Т.56.- №2.- С.50-57 (IF-0,410).
37. Литвяков Н.В. Градиентный феномен экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы при проведении неоадьювантной химиотерапии: связь с прогрессированием заболевания//Сибирский онкологический журнал 2013.- Т.58, №4, С.5-11 (IF-0,410).
38. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Денисов Е.В., Вторушин С.В., Христенко К.Ю., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В. Связь безметастатической выживаемости больных раком молочной железы и вектора изменения экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли при проведении неоадьювантной химиотерапии.//Вопросы онкологии.- 2013.- Т.59.-№3.- С.334-340 (IF-0,253).
39. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение.//Биохимия.- 2013.- Т.78, вып. 11.- С.1531-1549 (IF-1,353).
40. 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., Cherdynseva N.V. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistance gene expression.//Scientific reports.- 2014 - N4. 4709.- P.1-7. doi:10.1038/srep04709 (IF-5,078).
41. Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Чердынцева Н.В. Микрочиповый анализ числа копий ДНК опухоли молочной железы: связь с непосредственной эффективностью химиотерапии и экспрессией ABC-транспортеров.//Материалы V Съезда онкологов и радиологов Казахстана 29-30 апреля 2014 г. Алматы, Республика Казахстан, №115 (http://onco.kz/sites/default/files/tesis_v_siezd.pdf)

42. Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Иваньковская П.В., Ибрагимова М.К., Слонимская Е.М., Коростелев С.А., Чердынцева Н.В. Микроматричный анализ аномалий числа копий ДНК опухоли молочной железы: связь с эффектом неоадъювантной химиотерапии и экспрессией генов множественной лекарственной устойчивости. //Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» Москва 2014.- Том II раздел 8 .- С.60-61.
43. Литвяков Н.В., Цыганов М.М., Чердынцева Н.В., Слонимская Е.М., Иваньковская П.В., Ибрагимова М.К., Гарбузов Е.Ю., Коростелев С.А., Чердынцев Е.С., Потапова О.Ю., Чойнзонов Е.Л. Микроматричный анализ аномалий числа копий днк опухоли молочной железы: связь с эффектом неоадъювантной химиотерапии// Сибирский онкологический журнал.- 2014.- №3.- С.19-27 (IF-0,410)

РИД

Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2013621213 от 24 сентября 2013 г. Литвяков Н.В., Гарбузов Е.Ю., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Вторушин С.В., Завьялова М.В., Чердынцева Н.В. «База данных экспрессионных и клинико-патологических параметров пациентов с диагнозом рак молочной железы»

Глава в монографии

Denisov E.V., Cherdynseva N.V., Litviakov N.V., Malinovskaya E.A., Babyshkina N.N., Belyavskaya V.A., Voevoda M.I. TP53 Gene Polymorphisms in Cancer Risk: The Modulating Effect of Ageing, Ethnicity and TP53 Somatic Abnormalities.//Tumor Suppressor Genes Edited by Yue Cheng www.intechopen.com.- 2012 P.79-110.

Список сокращений

АТФ – аденоzinтрифосфорная кислота
АХТ – адъювантная химиотерапия
ВОЗ – всемирная организация здравоохранения
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЗНО – злокачественные новообразования
ИГХ – иммуногистохимия
МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
МЧ-ПЦР – метилчувствительная ПЦР
НАХТ – неоадъювантная химиотерапия
ПЦР – полимеразная цепная реакция
РМЖ – рак молочной железы
РНК – рибонуклеиновая кислота
УЗИ – ультразвуковое исследование
ABC – ATP-Binding Cassette
CGH – Comparative Genomic Hybridization
CNA – Copy Number Aberration (аберрации числа копий)
ER – рецептор эстрогенов
HER2 – рецептор эпидермального фактора роста
ЛОН – потеря гетерозиготности
MHC I – главный комплекс гистосовместимости 1 класса
OR – отношение шансов
Pgp – P-гликопротеин
PR – рецептор прогестерона
RIN – RNA Integrity Number
RR – относительный риск
RT-qPCR – количественная обратно-транскриптазная ПЦР в режиме реального времени
SE – стандартная ошибка
SNP – однонуклеотидный полиморфизм