

СВЯЗЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ХИМИОТЕРАПИИ С ОСОБЕННОСТЯМИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСМЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА (ABCB1), MRP2 (ABCC2), BCRP (ABCG2) У БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

К.Ю. Христенко^{1,2}, С.В. Вторушин^{1,2}, М.В. Завьялова^{1,2}, В.М. Перельмутер^{1,2}

Томский НИИ онкологии, г. Томск¹

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск²

634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: kychristenko@mail.ru¹

Аннотация

Эффективность неоадъювантной химиотерапии при инвазивном раке молочной железы может быть снижена в связи с развитием феномена множественной лекарственной устойчивости, причиной которого в большинстве случаев является экспрессия трансмембранных белков семейства ABC-транспортеров. Выполненное исследование позволило выявить взаимосвязь между экспрессией в клетках опухоли инвазивного рака молочной железы белков лекарственной устойчивости семейства ABC-транспортеров: Р-гликопротеина (ABCB1), MRP2 (ABCC2), BCRP (ABCG2), с эффективностью предоперационной химиотерапии и степенью лечебного патоморфоза опухолевой ткани. Было показано, что указанные параметры зависят от наличия мембранной экспрессии Р-гликопротеина и степени выраженности его экспрессии опухолевыми клетками. Эффективность неоадъювантной химиотерапии сопряжена с отсутствием экспрессии BCRP в клетках опухоли. Степень лечебного патоморфоза в опухоли связана с наличием позитивной мембранной экспрессии MRP2, а также с уровнем мембранной экспрессии Р-гликопротеина в клетках инвазивного рака молочной железы.

Ключевые слова: множественная лекарственная устойчивость, ABC-транспортеры, Р-гликопротеин, MRP2, BCRP, рак молочной железы, эффективность неоадъювантной химиотерапии, лечебный патоморфоз.

Рак молочной железы занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости у женщин [1]. В настоящее время при лечении инвазивной карциномы молочной железы одну из ключевых ролей играет проведение неоадъювантной химиотерапии, использование которой направлено на уменьшение объема опухоли для облегчения оперативного вмешательства и позволяет определить чувствительность к той или иной схеме химиотерапии [2, 3]. Химиотерапия как один из вариантов лечения существенно теряет свою актуальность в связи с наличием феномена множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) опухолевых клеток, на долю которого приходится около 90 % неудач лечения цитостатическими препаратами [4]. Феномен МЛУ – это состояние, при котором имеет место широкая кросс-резистентность клеток к веществам, различным по структуре и механизму действия [5]. Резистентность опухоли формируется посредством нескольких молекулярных механизмов. На первый план выходит механизм функционирования транспортных белков семейства ABC-транспортеров,

который обеспечивает эффлюкс химиопрепаратов из клетки против градиента концентрации с затратой энергии АТФ, что приводит к быстрому уменьшению внутриклеточного уровня препарата ниже терапевтических концентраций. Существенная роль в развитии резистентности к проводимому лечению принадлежит представителям трех субсемейств данной группы, а именно белку подсемейства ABCB – Р-гликопротеину, MRP2, относящемуся к субсемейству ABCC, и представителю ABCG-транспортеров – BCRP [5–9].

Целью исследования явилось изучение связи особенностей экспрессии Р-гликопротеина (ABCB1), MRP2 (ABCC2), BCRP (ABCG2) в клетках опухоли с эффективностью неоадъювантной химиотерапии и выраженностью лечебного патоморфоза у больных с инвазивной карциномой молочной железы.

Материал и методы

Морфологической оценке подвергался биопсийный и операционный материал, полученный от 91 больной с инвазивным раком молочной железы

T₁₋₄N₀₋₃M₀ стадий. Все пациентки получали лечение в отделении общей онкологии Томского НИИ онкологии в период с 2007 по 2014 г. На предоперационном этапе пациенткам проводилось 2–4 курса неoadьювантной терапии по схемам FAC, CAX и CMF. Эффективность химиотерапии оценивалась по шкале RECIST.

Материал фиксировался в 10 % растворе нейтрального формалина. Проводка материала и изготовление гистологических препаратов осуществлялись по стандартной методике. Препараты окрашивались гематоксилином и эозином. Гистологический тип рака устанавливался согласно рекомендациям ВОЗ (2012). Выраженность лечебного патоморфоза оценивалась по схеме, предложенной Е.Ф. Лушниковым (1977), при исследовании операционного материала ткани молочной железы и регионарных лимфатических узлов.

Иммуногистохимическое исследование проводилось на биопсийном материале и осуществлялось по стандартной методике. Применялись антитела фирмы «Дакко» к рецепторам эстрогена (клон ID5, RTU, мышинные), к рецепторам прогестерона (клон PgR636, RTU, мышинные), к онкопротеину c-erbB-2 (HER2/neu статус) (рабочее разведение 1:500, кроличьи), к Ki-67 (клон MIB-1, RTU, мышинные); фирмы «Авсам» к Р-гликопротеину (клон JSB-1, рабочее разведение 1:40), к MRP2 (клон M2 III-6, рабочее разведение 1:200), к VCRP (клон VXP-21, рабочее разведение 1:20). Оценка экспрессии рецепторов к половым гормонам проводилась количественным методом гисто-счета (Histo-Score). При оценке экспрессии к онкопротеину c-erbB-2 учитывали мембранное окрашивание этого маркера. Для HER2/neu негативными считались случаи с отсутствием окрашивания. Экспрессия Ki-67 оценивалась по процентному содержанию позитивно окрашенных клеток на 1 000 клеток в 10 полях зрения при $\times 400$.

В исследование были включены пациентки с трижды негативным (негативная экспрессия рецепторов к эстрогенам, к прогестерону, негативный HER2/neu статус) и люминальным В (позитивная экспрессия рецепторов к эстрогенам и/или к прогестерону, негативный HER2/neu статус, экспрессия Ki-67 ≥ 20 %) субтипами.

Оценивалось наличие экспрессии Р-гликопротеина, MRP2, VCRP, определялся процент по-

зитивно окрашенных клеток (на 1 000 клеток в 10 полях зрения при $\times 400$), при этом учитывался характер окрашивания в опухоли (мембранное, цитоплазматическое, ядерное).

Обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ Statistica 10.0. Применялся дисперсионный анализ, критерий χ^2 , корреляционно-регрессионный анализ по Спирмену. Обсуждаются результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией различий при $p < 0,1$.

Результаты и обсуждение

При оценке эффективности неoadьювантной химиотерапии в общей группе частота полных морфологических регрессий составила 23,1 %, частичных регрессий – 49,4 %, стабилизация процесса наблюдалась в 19,8 % случаев, и прогрессирование было отмечено у 7,7 % пациентов. У 83 (91,21 %) пациенток был выявлен лечебный патоморфоз различной степени выраженности, и у 8 (8,79 %) пациенток реакции опухолевой ткани на проведение химиотерапии не наблюдалось. Преобладала I степень лечебного патоморфоза – 26,37 %, на долю II степени приходилось 24,18 %, III степень составила 16,48 %, IV степень – 24,18 %. Частота позитивной экспрессии и показатели экспрессии указанных белков у пациенток с трижды негативным и люминальным раком типа В не имели существенных отличий.

Исследование эффектов неoadьювантной химиотерапии в зависимости от наличия мембранной экспрессии Р-гликопротеина показало существенные различия. Было обнаружено, что в 79 % случаев негативной мембранной экспрессии данного белка у пациенток наблюдалась полная или частичная регрессия опухоли от проводимого лечения, в 21 % – стабилизация либо прогрессирование роста опухоли ($p=0,002$). При позитивной экспрессии данного белка эффективность химиотерапии зависела от процента позитивно окрашенных клеток в опухоли. Наибольшие показатели мембранной экспрессии Р-гликопротеина наблюдались при прогрессировании заболевания, наименьший процент позитивных клеток выявлялся в группе больных с полной морфологической регрессией новообразования, что проявлялось положительной корреляцией ($r=0,23$; $p=0,03$) (табл. 1).

Таблица 1

Показатели экспрессии Р-гликопротеина у пациенток с различным эффектом неoadьювантной химиотерапии

Эффекты по шкале RECIST	Мембранная экспрессия Р-гликопротеина в опухоли, доля позитивных клеток (M \pm S.D.)
Полная регрессия (n=12)	51,2 \pm 11,3 %
Частичная регрессия (n=24)	65,8 \pm 5,9 %
Стабилизация (n=12)	74,5 \pm 9,8 %
Прогрессирование (n=4)	95,2 \pm 5,0 %
	F=3,2; p=0,003

Таблица 2

Зависимость степени лечебного патоморфоза в опухоли от мембранной экспрессии MRP2 в опухолевых клетках инвазивной карциномы молочной железы

Степень лечебного патоморфоза	Мембранная экспрессия MRP2 в клетках опухоли, количество больных (абс. число, %)	
	Негативная	Позитивная
Признаки отсутствуют	3/50 (6 %)	5/41 (12 %)
I степень	9/50 (18 %)	15/41 (36 %)
II степень	13/50 (26 %)	9/41 (22 %)
III степень	12/50 (24 %)	4/41 (10 %)
IV степень	13/50 (26 %)	8/41 (20 %)

$\chi^2=5,9; p=0,03$

Таблица 3

Зависимость эффекта неoadъювантной химиотерапии от экспрессии BCRP в первичной опухоли

Эффекты по шкале RECIST	Экспрессия BCRP в опухоли, количество больных (абс. число, %)	
	Негативная	Позитивная
Полная регрессия (n=21)	13/37 (35 %)	8/54 (15 %)
Частичная регрессия (n=45)	18/37 (48 %)	27/54 (50 %)
Стабилизация (n=18)	5/37 (14 %)	13/54 (24 %)
Прогрессирование (n=7)	1/37 (3 %)	6/54 (11 %)

$\chi^2=7,1; p=0,04$

Таблица 4

Показатели экспрессии BCRP в опухоли у пациенток с инвазивной карциномой молочной железы в зависимости от эффекта проводимого лечения

Эффекты по шкале RECIST	Экспрессия BCRP в опухолевых клетках (M ± S.D.)
Полная регрессия (n=8)	61,1 ± 11,7 %
Частичная регрессия (n=27)	86,0 ± 9,0 %
Стабилизация (n=13)	87,0 ± 3,06 %
Прогрессирование (n=6)	94,6 ± 2,9 %

F=5,4; p=0,002

Степень лечебного патоморфоза (ЛП) в первичной опухоли после проведения предоперационной химиотерапии также была связана с уровнем мембранной экспрессии Р-гликопротеина в клетках инвазивного рака. Было обнаружено нарастание степени лечебного патоморфоза при более низких показателях экспрессии данного АВС-транспортера в клетках опухоли (I степень – 69,5 ± 8,5 %; II степень – 73,6 ± 10,1 %; III степень – 80,6 ± 7,7 %; IV степень – 51,1 ± 10,9 %; F=3,4; p=0,03).

При изучении экспрессии MRP2 показано, что степень лечебного патоморфоза опухоли сопряжена с его мембранной экспрессией в клетках опухоли. При позитивной мембранной экспрессии данного АВС-транспортера чаще регистрировались либо ЛП I степени, либо отсутствие морфологических признаков лечебного воздействия, в то время как ЛП III и IV степени чаще наблюдались при отрицательной экспрессии данного белка (табл. 2).

Анализ чувствительности к неoadъювантной химиотерапии у больных инвазивной карциномой молочной железы, в зависимости от наличия экспрессии белка BCRP, показал, что мембранная экспрессия данного белка была связана с ответом опухоли на проводимое лечение (табл. 3). Установлено, что частота полной морфологической регрессии была существенно выше при отсутствии экспрессии данного АВС-транспортера в опухоли, а прогрессирование при проведении неoadъювантной химиотерапии значимо чаще наблюдается при позитивном мембранном окрашивании.

Анализ мембранной экспрессии BCRP в клетках опухоли выявил, что показатели экспрессии данного белка в группах пациенток с различным эффектом от проведенной неoadъювантной химиотерапии имеют значимые отличия (табл. 4), наименьший показатель экспрессии был у пациенток с полной регрессией опухоли после проведения

химиотерапии, наибольший – отмечен в группе больных с прогрессирующим опухолем.

Заключение

Выполненное исследование показало, что эффективность неoadъювантной химиотерапии и степень лечебного патоморфоза в опухоли связаны с наличием мембранной экспрессии Р-гликопротеина и степени выраженности его экспрессии опухолевыми клетками. В 79 % случаев негативной мембранной экспрессии данного белка у пациенток наблюдается полная или частичная регрессия опухоли.

Полная морфологическая регрессия первичной опухоли при проведении предоперационной химиотерапии сопряжена с отсутствием экспрессии BCRP в клетках опухоли. Степень лечебного патоморфоза в опухоли связана с наличием пози-

тивной мембранной экспрессии MRP2 и с уровнем мембранной экспрессии Р-гликопротеина в клетках инвазивного рака молочной железы.

Выявленные данные позволяют рассматривать белки ABCB1 (Р-гликопротеин), MRP2 (ABCC2), BCRP (ABCG2) в качестве прогностических факторов эффективности неoadъювантной терапии и степени лечебного патоморфоза в ответ на проводимую терапию у больных инвазивным раком молочной железы.

Исследование выполнено в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых МД-9084.2016.7 «Разработка новых подходов к прогнозированию резистентности гормонотерапии у больных люминальным раком молочной железы на основании оценки клинико-морфологических и молекулярно-генетических параметров опухоли» (договор № 14.W01.16.9084-МД) от 14.03.2016.

ЛИТЕРАТУРА

1. Youlden D.R., Cramb S.M., Dunn N.A., Muller J.M., Pyke C.M., Baade P.D. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 2012 Jun; 36 (3): 237–48. doi: 10.1016/j.canep.2012.02.007.
2. Gampenrieder S.P., Rinnerthaler G., Greil R. Neoadjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy in Breast Cancer: Past, Present, and Future. *J Oncol.* 2013; 2013: 732047. doi: 10.1155/2013/732047.
3. von Minckwitz G., Untch M., Loibl S. Update on neoadjuvant/preoperative therapy of breast cancer: experiences from the German Breast Group. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2013 Feb; 25 (1): 66–73. doi: 10.1097/GCO.0b013e32835c0889.
4. Pluchino K.M., Hall M.D., Goldsborough A.S., Callaghan R., Gottesman M.M. Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012 Feb-Apr; 15 (1–2): 98–105. doi: 10.1016/j.drug.2012.03.002.
5. Stavrovskaya A.A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc).* 2000 Jan; 65 (1): 95–106.
6. Borst P., Evers R., Koel M., Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 16; 92 (16): 1295–302.
7. Fukuda Y., Schuetz J.D. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2012 Apr 15; 83 (8): 1073–83. doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.042.
8. Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R. Jr., Chen Z.N. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat.* 2015 Jan; 18: 1–17. doi: 10.1016/j.drug.2014.11.002.
9. Wikens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep.* 2015 Feb 3; 7:14. doi: 10.12703/P7-14.

Поступила 26.02.16
Принята в печать 29.04.16

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Христенко Ксения Юрьевна, врач-патологоанатом отделения патологической анатомии и цитологии, Томский НИИ онкологии; ассистент кафедры патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: kychristenko@mail.ru. SPIN-код: 2867-6441.

Вторушин Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии, Томский НИИ онкологии; профессор кафедры патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: wtorushin@rambler.ru. SPIN-код: 2442-4720.

Завьялова Марина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, старший научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии, Томский НИИ онкологии; заведующая кафедрой патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: zavyalovamv@mail.ru. SPIN-код: 1229-0323.

Перельмутер Владимир Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения патологической анатомии и цитологии, Томский НИИ онкологии; профессор кафедры патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России (г. Томск, Российская Федерация). E-mail: pvm@ngs.ru. SPIN-код: 6252-5319.

CORRELATION BETWEEN CHEMOTHERAPY RESPONSE AND EXPRESSION PROFILES OF TRANSMEMBRANE PROTEINS: P-GLYCOPROTEIN (ABCB1), MRP2 (ABCC2), BCRP (ABCG2) IN PATIENTS WITH INVASIVE BREAST CANCER

K.Yu. Khristenko^{1,2}, S.V. Vtorushin^{1,2}, M.V. Zavjalova^{1,2}, V.M. Perelmuter^{1,2}

Siberian State Medical University, Tomsk¹
Tomsk Cancer Research Institute, Russia, Tomsk²
5, Kooperativny Street, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: kychristenko@mail.ru¹

Abstract

Overexpression of ABC drug transporters can cause multidrug resistance (MDR) in cancer cells, which is a major obstacle in the success of cancer chemotherapy. Our study revealed a correlation between the expression of invasive breast cancer resistance-associated proteins, such as P-glycoprotein (ABCB1), MRP2 (ABCC2), BCRP (ABCG2) in tumor cells and pathologic response to neoadjuvant chemotherapy. The response to neoadjuvant chemotherapy was shown to be associated with a lack of BCRP expression in tumor cells. The pathologic tumor response was correlated with the presence of positive MRP2 expression and the expression level of P-glycoprotein in cells of invasive breast cancer.

Key words: multidrug resistance, ABC-transporters, P-glycoprotein, MRP2, BCRP, breast cancer, pathologic response to neoadjuvant chemotherapy.

REFERENCES

1. Youlden D.R., Cramb S.M., Dunn N.A., Muller J.M., Pyke C.M., Baade P.D. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 2012 Jun; 36 (3): 237–48. doi: 10.1016/j.canep.2012.02.007.
2. Gampenrieder S.P., Rinnerthaler G., Greil R. Neoadjuvant Chemotherapy and Targeted Therapy in Breast Cancer: Past, Present, and Future. *J Oncol.* 2013; 2013: 732047. doi: 10.1155/2013/732047.
3. von Minckwitz G., Untch M., Loibl S. Update on neoadjuvant/preoperative therapy of breast cancer: experiences from the German Breast Group. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2013 Feb; 25 (1): 66–73. doi: 10.1097/GCO.0b013e32835c0889.
4. Pluchino K.M., Hall M.D., Goldsborough A.S., Callaghan R., Gottesman M.M. Collateral sensitivity as a strategy against cancer multidrug resistance. *Drug Resist Updat.* 2012 Feb-Apr; 15 (1–2): 98–105. doi: 10.1016/j.drup.2012.03.002.
5. Stavrovskaya A.A. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry (Mosc).* 2000 Jan; 65 (1): 95–106.
6. Borst P., Evers R., Koel M., Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Aug 16; 92 (16): 1295–302.
7. Fukuda Y., Schuetz J.D. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochem Pharmacol.* 2012 Apr 15; 83 (8): 1073–83. doi: 10.1016/j.bcp.2011.12.042.
8. Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R. Jr., Chen Z.N. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat.* 2015 Jan; 18: 1–17. doi: 10.1016/j.drup.2014.11.002.
9. Wikens S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep.* 2015 Feb 3; 7: 14. doi: 10.12703/P7-14.

Received 26.02.16
Accepted 29.04.16

ABOUT THE AUTHORS

Khristenko Ksenya Yu., MD, Physician of the Department of Pathologic Anatomy and Cytology of Tomsk Cancer Research Institute; Lecturer of Pathological Anatomy Department of Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: kychristenko@mail.ru. SPIN-code: 2867-6441.

Vtorushin Sergey V., MD, DSc, Senior Researcher of the Department of Pathologic Anatomy and Cytology of Tomsk Cancer Research Institute; Professor of Pathological Anatomy Department of Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: wtorushin@rambler.ru. SPIN code: 2442-4720.

Zavyalova Marina V., MD, DSc, Professor, Senior Researcher of the Department of Pathological Anatomy and Cytology of Tomsk Cancer Research Institute; Head of Pathological Anatomy Department of Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: zavyalovamv@mail.ru. SPIN-code: 1229-0323.

Perelmuter V.M., MD, DSc, Professor, Head of Department of Pathological Anatomy and Cytology, Tomsk Cancer Research Institute; Professor of Department of Pathological Anatomy of Siberian State Medical University (Tomsk, Russian Federation). E-mail: pvm@ngs.ru. SPIN-code: 6252-5319.