

Н.В. Литвяков^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,2}

Клинические исследования вклада ABC-транспортеров в реализацию фенотипа множественной лекарственной устойчивости рака молочной железы

¹ Лаборатория онковирусологии Томского НИИ онкологии

² Лаборатория трансляционной клеточной и молекулярной биомедицины Национального исследовательского Томского государственного университета, Томск

Обсуждаются клинические исследования по связи уровня экспрессии генов и белков ABC-транспортеров в опухолевой ткани молочной железы с непосредственной эффективностью химиотерапии и исходом заболевания. Рассматривается предсуществующая множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), которая определяется исходным уровнем экспрессии генов и белков ABC в опухоли до лечения, а также адаптивная МЛУ, которая возникает в опухолевых клетках в процессе химиотерапии под воздействием лекарственных средств. Связь предсуществующей МЛУ с эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) рака молочной железы (РМЖ) и выживаемостью пациентов, как оказалось, вариабельна. В то же время, практически во всех клинических исследованиях адаптивная МЛУ показала хорошую ассоциацию и с непосредственной эффективностью химиотерапии, и с исходом заболевания. На материале собственных исследований показана связь повышения экспрессии генов ABC в опухолевой ткани молочной железы при проведении НАХТ с плохим ответом на НАХТ и низкой безметастатической выживаемостью (50-55%), в то время как снижение экспрессии сопряжено с объективным ответом и благоприятным исходом (73-78%). Делается вывод о необходимости дальнейшего развития стратегии преодоления фенотипа МЛУ.

Ключевые слова: ABC-транспортеры, множественная лекарственная устойчивость, рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, выживаемость

Основной причиной неэффективности химиотерапии опухоли считают формирование фенотипа множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), который характеризуется способностью опухолевых клеток выживать в условиях высоких доз широкого спектра химиопрепаратов. Выделяют два типа МЛУ: во-первых, это предсуществующая МЛУ, или МЛУ до лечения, которая определяется индивидуальными особенностями

опухоли и организма больного. Кроме того, она зависит от гистогенеза опухоли; в частности, высокая предсуществующая МЛУ наблюдается у опухолей, происходящих из метаболических активных тканей (почки, печень, поджелудочная железа и др.). При предсуществующей МЛУ все клетки опухоли оказываются устойчивыми к химиотерапии еще до начала лечения. Второй тип лекарственной устойчивости – это приобретенная или адаптивная МЛУ, которая возникает в опухолевых клетках в процессе химиотерапии под воздействием лекарственных средств [30,46].

Фенотип множественной лекарственной устойчивости связывают с функционированием семейства генов ABC-транспортеров (ATP-Binding Cassette); их работу продуктов этих генов) считают мажорным механизмом лекарственной устойчивости [18]. Энергозависимые ABC-транспортеры могут синтезироваться всеми клетками организма и в норме выполняют физиологическую функцию экспорта против градиента концентрации из клеток различных метаболитов, ксенобиотиков, холестерина, нейтральных и катионных органических соединений, глутатиона, органических анионов, лейкотриенов, аналогов циклических нуклеотидов и мн. др. В опухолевых клетках ABC-транспортеры осуществляют выброс цитостатических препаратов, таргетных (лапатиниб, иресса, софатиниб, герцептин, акситиниб и др.) и гормональных средств против градиента концентрации с затратой энергии АТФ [4,13,41,53,54].

Роль генов ABC-транспортеров в формировании фенотипа предсуществующей и адаптивной МЛУ, прежде всего, была доказана в опытах *in vitro* по их трансфекции в чувствительные к цитостатикам линии клеток и в экспериментах по индукции экспрессии генов ABC-транспортеров в клетках, которые в результате этого оказывались устойчивыми к химиопрепаратам [3,19,20,27]. В широкомасштабных исследованиях G. Szakacs et al., [45] была изучена экспрессия всех 48 генов МЛУ в 60 раковых клеточных линиях, обработанных 1429 различными химическими агентами (противоопухолевыми препаратами и канди-

датами на роль противоопухолевых средств) и установлено, что высокий уровень экспрессии генов ABC-транспортеров (предсуществующая МЛУ) и индукция их экспрессии при воздействии химиопрепаратов (адаптивная МЛУ) определяет химиорезистентность опухолевых клеток. Кроме того, в исследованиях *in vitro* определены многие механизмы активации экспрессии генов ABC-транспортеров при воздействии химиопрепаратов и росте опухоли, с. м. обзор K.G Chen et al. [7].

Классификация и структура ABC-транспортеров

В настоящее время известно, что семейство ABC-транспортеров, кодируется 50 генами, которые объединяют в 5 подсемейств (A, B, C, D, G) и ряд неклассифицированных ABC-транспортеров. Наиболее известные из ABC-транспортеров, которые связаны с фенотипов МЛУ, это: из подсемейства B – *ABCB1* (*MDR1* – multidrug resistance gene-1), из подсемейства C — *ABCC1-5* (*MRP1-5* — multidrug resistance-associated protein 1-5), из подсемейства G — *ABCG2* и *ABCG1* (*BCRP* и *BCRP1* – breast cancer resistance protein) [25]. Строение (всех представителей семейства является консервативным и объединено доменной организацией, которая включает в себя различные комбинации из двух функциональных субъединиц: TMD (transmembran ebinding domen) или MSD-трансмембранная субъединица, состоящая из шести спиралей, и NBD (nucleotid binding domen) – субъединица, состоящая из двух доменов. Домены NBD носят название A. Walker, который связывается с остатком фосфорной кислоты молекулы АТФ и B. Walker, который содержит аспарат и связывается с магнием [33,47,48,51,52]. Все ABC-транспортеры по своей структуре подразделяются на полные и неполные (половинные). Полные характеризуются структурой (TMD-NBD)₂ и локализируются в плазматической мембране клетки. Транспортеры со структурой TMD-NBD называют неполными и находятся обычно на внутриклеточных мембранах (лизосомальных, митохондриальных, эндоплазматическом ретикулуме), единственным исключением является неполный (белок) *Abcg2* (он же *Bcpr*), локализованный и на плазматической мембране клетки [39,51].

Клинические исследования значения ABC-транспортеров в формировании фенотипа МЛУ опухоли молочной железы

Известные работы по этой тематике условно разделены нами на исследования клинической значимости уровня экспрессии ABC-

транспортеров при предсуществующей МЛУ и изменения экспрессии ABC-транспортеров в процессе химиотерапии (или адаптивной МЛУ) и реализации устойчивости и чувствительности опухоли молочной железы к химиотерапии. Неоднозначность результатов является общей чертой клинических исследований; данные о связи экспрессии ABC-транспортеров с показателями ответа на химиотерапию: непосредственной эффективностью химиотерапии, общей и безметастатической выживаемостью пациентов оказываются крайне противоречивыми при раке молочной железы (РМЖ) [54].

Клинические исследования предсуществующей МЛУ опухоли молочной железы

Многочисленные исследования стремились установить роль ABC-транспортеров в формировании фенотипа МЛУ и связать их экспрессию до лечения или предсуществующую МЛУ с реакцией на химиотерапию. Исследования у больных РМЖ опухоли с плохим ответом на неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) не выявили экспрессии Р-гликопротеина (продукта гена *ABCB1*) до лечения [12]. Испанские ученые изучали экспрессию генов и белков *ABCB1* и *MVP* у 52 больных РМЖ, которые получали 6 курсов НАХТ по схема FАC и CMF. Эффективность химиотерапии оценивали по шкале RECIST. Была обнаружена связь экспрессии генов *ABCB1* и *MVP* с лимфогенным метастазированием до и после НАХТ, но связь с ответом на химиотерапию так и не была установлена [42]. В исследованиях I.F. Faneyte et al. показано, что хотя мРНК *ABCC1-3* была обнаружена в опухолях молочной железы всех пациентов, но связи с эффективностью НАХТ установлено не было [15]. Кроме этого, та же группа исследовала экспрессию гена *ABCG2* и его связь с эффективностью химиотерапии по антрациклин-содержащим схемам НАХТ. Никакой достоверной корреляции между уровнем экспрессии данного гена и эффектом терапии найдено не было [14]. Уровень экспрессии гена *ABCB1* в опухоли 80 больных до лечения статистически не различался у отвечающих и не отвечающих на НАХТ пациентов [43]. В исследовании В. Kim et al. с помощью полуколичественного иммуногистохимического метода изучали экспрессию белков Р-гликопротеина, *Bcpr* и *Mgp1* в опухоли молочной железы до лечения и после НАХТ. Уровень экспрессии белков до лечения не показал связи с эффектом НАХТ. Только у больных с полной морфологической регрессией уровень Р-гликопротеина был статистически значимо выше, чем у всех

остальных пациентов, что вызвало у авторов немало вопросов [26].

Иммуногистохимические исследования 50 больных РМЖ показали связь уровня экспрессии Р-гликопротеина до лечения с плохим ответом на НАХТ [10]. С.С. Wang et al. было показано, что экспрессия гена *ABCBI* коррелировала не только с резистентностью к НАХТ, но и с резистентностью к гормональной терапии РМЖ [53]. Описана попытка связать уровни экспрессии всех генов МЛУ с клиническим результатом лечения пациентов. S. Park et al. с коллегами при использовании микроматриц исследовали экспрессию 48 генов ABC в опухоли до лечения и связь с эффективностью неoadъювантной химиотерапии [37]. Выборка включала 21 больную с РМЖ, которые получали 4 курса химиотерапии по схеме 5-фторурацил, эпирубицин и циклофосфан (FEC). Больные были разделены на две группы: с наличием (полная+частичная регрессия) и отсутствием клинического ответа (стабилизация+прогрессирование) на неoadъювантную химиотерапию по классификации ВОЗ. Ситуация оказалась парадоксальной: с эффектом НАХТ был связан как высокий, так и низкий уровень экспрессии ряда генов ABC до лечения [37].

Голландские ученые провели исследование связи уровня экспрессии 4-х ABC-транспортеров *ABCBI*, *ABCC1*, *ABCC2* и *ABCG2* у больных РМЖ до и после НАХТ с ее эффектом. Группа пациентов включала в себя 56 человек, которые были разделены в зависимости от эффекта НАХТ. У 34 пациентов отмечался ответ на НАХТ и у 22 больных ответ на НАХТ отсутствовал. Статистически значимая связь с эффектом НАХТ отмечалась только для гена *ABCBI*. Ответ на НАХТ наблюдался при низком уровне экспрессии *ABCBI* до лечения, экспрессия остальных генов не коррелировала с ответом на НАХТ [6]. Экспрессия гена *ABCC5* оказалась связана с резистентностью к 5-фторурацилу и была наиболее высока в группе пациентов без клинического эффекта НАХТ [38].

J.P. Chintamani et al. при исследовании экспрессии Р-гликопротеина в биоптатах до лечения и в операционном материале после НАХТ 50 больных раком молочной железы показал значительную отрицательную корреляцию между уровнем экспрессии Р-гликопротеина в опухоли до лечения и ответом на НАХТ. Экспрессия *ABCBI* в 70% опухолей молочной железы (n=50) была значительно увеличена по сравнению с нормальной тканью железы. Изначально высокий уровень экспрессии гена *ABCBI* был сопряжен со слабым клиническим эффектом НАХТ [9].

Результаты мета-анализов, которые по идее должны были объединить все исследования и расставить все точки над «и», также оказались

в значительной степени противоречивы. Мета-анализ В.Т. Trock et al., включающий 660 пациентов, показал статистически значимую связь ($p < 0,001$) исходного уровня экспрессии Р-гликопротеина и эффекта НАХТ [50]. К сожалению, в этом мета-анализе не проводили исследования на однородность выборки. Мета-анализы, проведенные позднее не установили четкой связи экспрессии Р-гликопротеина до лечения с эффектом химиотерапии [11, 31]. В мета-анализе 2005 года было обследовано 115 пациентов с высоким показателем однородности и показано, что у Р-гликопротеин — положительных до лечения пациентов число больных, отвечающих на терапию на НАХТ не была выше, чем у Р-гликопротеин — отрицательных больных, уровень p достиг значения 0,088 [11]. Эти данные поддержаны в обзоре N.S. Wind и I. Hoen, где говорят о гетерогенности клинической значимости экспрессии белков и генов ABC-транспортеров и делают вывод о том, что четкая связь высокого уровня экспрессии ABC-транспортеров в опухоли молочной железы с устойчивостью к химиотерапии так и не была идентифицирована [54].

Таким образом, объемная литература свидетельствует о том, что в клинических условиях для рака молочной железы предсуществующая множественная лекарственная устойчивость, обусловленная экспрессией ABC-транспортеров, не играет существенной роли в реализации механизмов устойчивости опухоли к химиотерапии. Это идет вразрез с множеством данных, полученных *in vitro*, о значении изначально высокой экспрессии ABC-транспортеров в резистентности клеток карциномы молочной железы (MCF7 и др.) к цитостатическим препаратам [3,19-20,27].

Клинические исследования адаптивной МЛУ опухоли молочной железы

Приобретенная или адаптивная МЛУ, которую характеризует изменение экспрессии ABC-транспортеров в опухолевых клетках при воздействии химиопрепаратами, также активно изучалась при раке молочной железы в отношении связи с эффектом химиотерапии. Повышение экспрессии генов и белков ABC было не раз продемонстрировано в работах *in vitro* на клеточных линиях. Имеются и некоторые клинические исследования в этом плане, хотя их значительно меньше, чем клинических исследований предсуществующей МЛУ.

Так, в 2006 г. было проведено масштабное микроматричное исследование экспрессии ABC-транспортеров в опухолях молочной железы [17]. Его предварительные результаты показали, что из 41 исследуемого ABC-транспортера,

38 генов высоко экспрессируются либо в операционном материале опухоли молочной железы (после химиотерапии), либо до лечения. При этом для 23 генов ABC высокий уровень экспрессии наблюдался как до, так и после лечения. Таким образом, повышенная экспрессия большинства ABC-транспортеров является характерной чертой опухолей молочной железы. Сравнение уровня экспрессии большинства генов ABC до и после проведения химиотерапии показало, что статистически достоверных различий между этими периодами нет. Только три гена *ABCC6/8/9* более высоко экспрессировались в образцах опухоли до лечения. Полученный результат, по мнению авторов, указывает на то, что эти гены могут принимать участие в формировании резистентности опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам. Из трех вышеназванных генов существенную роль играет ген *ABCC6*. Высокая экспрессия этого гена придает опухолевым клеткам молочной железы устойчивость к таким химиопрепаратам как эпозид, доксорубин, даунорубин и актиномицин D [17].

Высокий уровень экспрессии генов *ABCA12*, *ABCA1*, *ABCC5*, *ABCC13*, *ABCB6* и *ABCC11* после НАХТ был ассоциирован с отсутствием ответа на химиотерапию [37]. Экспрессия части из 48 генов ABC до лечения (среди которых *ABCC1* и *ABCG1*) оказалось статистически значимо выше по сравнению с нормальной тканью; у части генов, в частности, *ABCG1* экспрессия была ниже, чем в нормальной ткани. Связь с эффектом выявлена только для гена *ABCA12*. У пациентов со стабилизацией и прогрессированием уровень экспрессии гена *ABCA12* после НАХТ был значительно повышен [21].

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

C. Atalay et al. показали, что у пациентов, у которых в процессе НАХТ индуцировалась экс-

прессия гена *ABCB1*, отсутствовал ответ на химиотерапию, и практически у всех пациентов, у которых не индуцировалась экспрессия *ABCB1*, наблюдался ответ на химиопрепараты [5]. Исследования экспрессии гена *ABCB1* в опухоли молочной железы и ее связи с эффективностью неоадьювантной химиотерапии показали ассоциацию высокого уровня экспрессии данного гена после лечения с отсутствием ответа на проведенную химиотерапию [6]. Chintamani et al. показали, что до лечения экспрессия Р-гликопротеина наблюдалась у 52% больных РМЖ, после НАХТ по схеме FAC экспрессия Р-гликопротеина отмечалась в опухоли 73,5% пациентов [9]. L. Singh et al. при исследовании 80 больных РМЖ, которые получали НАХТ по схеме CAF, продемонстрировали увеличение экспрессии гена *ABCB1* в опухоли молочной железы после НАХТ, но уровень экспрессии не различался у ответивших и не ответивших на НАХТ пациентов [43]. В исследовании M. Rudas et al. отмечалось, что 54% опухолей больных РМЖ до лечения экспрессировали Р-гликопротеин, а под действием НАХТ положительными по экспрессии Р-гликопротеина становились 100% опухолей. Отмечалось также повышение частоты экспрессии генов *ABCC1* и *MVP* в опухолях молочной железы после НАХТ с 62% до 88% и с 66% до 97% соответственно [40].

В мета-анализе V.J. Trock et al. было продемонстрировано повышение экспрессии Р-гликопротеина в опухоли молочной железы в ответ на НАХТ [50]. В мета-анализе 2003 г. было установлено, что больные слабо отвечали на лечение, если экспрессия Р-гликопротеина отмечалась и после НАХТ (адаптивная МЛУ) Было установлено, что начальная экспрессия Р-гликопротеина в опухоли молочной железы наблюдается в 40% случаев, в то время как после НАХТ частота экспрессии Р-гликопротеина увеличивается до 58% [31]. Аналогичные данные представлены и в более позднем мета-анализе: до лечения отмечается 46% Р-гликопротеин-положительных опухолей молочной железы, а после лечения больных химиопрепаратами, которые являются субстратами Р-гликопротеина, частота Р-гликопротеин-позитивных опухолей увеличивается до 68%. При этом повышение экспрессии Р-гликопротеина коррелировало с отсутствием ответа на НАХТ [11].

В наших предыдущих исследованиях 84 больных РМЖ было установлено, что у пациенток с объективным ответом на НАХТ наблюдалось снижение экспрессии генов ABC-транспортеров, а у больных с отсутствием ответа происходит повышение экспрессии генов ABC. Эффект химиотерапии, как оказалось, связан не с уровнем экспрессии генов ABC до лечения (предсуще-

ствующей МЛЮ), а с изменением их экспрессии в опухолевой ткани в процессе лечения (адаптивной МЛЮ) [32]. В табл. 1 представлены результаты исследования 106 больных РМЖ, получавших НАХТ, показывающие связь направления изменения экспрессии генов ABC с эффектом НАХТ.

Таблица 1.
Изменение экспрессии генов ABC-транспортёров 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%)	0,094
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%)	0,018
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 <http://vassarstats.net/odds2x2.html>, курсивом выделены статистически значимые различия.

Если экспрессия в образце до лечения была ниже, чем в операционном материале после НАХТ, то говорили о повышении экспрессии гена у данного больного. В случае, если экспрессия до лечения была выше, чем в операционном материале, то говорили о снижении экспрессии гена у данного больного, отсутствие экспрессии гена в обоих образцах также приравнивали к снижению экспрессии. В табл. 1 отражена связь направления изменения экспрессии ABC-транспортёров с эффективностью НАХТ. У пациенток с объективным клиническим ответом опухоли на НАХТ снижается экспрессия генов ABC в 61-84% случаев, а у пациенток с отсутствием ответа в процессе проведения химиотерапии повышается экспрессия этих генов в опухолевой ткани в 63-88% случаев ($0,018 < p < 1,1 \times 10^{-12}$).

Таким образом, нами был установлен факт связи с эффективностью НАХТ не уровня, а изменения экспрессии генов МЛЮ: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *MVP*, *ABCG1* и *ABCG2* в опухоли в ходе лечения (т.е. с процессом формирования адаптивной МЛЮ). Повышение экспрессии ABC-транспортёров в опухоли в процессе химиотерапии характеризует отсутствие ответа на химиотерапию, а снижение экспрессии ABC-транспортёров – хороший ответ на НАХТ. Как полагает М. Т. Куо, будущие работы должны

сосредоточиться на молекулярном исследовании того, как регулируется экспрессия генов МЛЮ в нормальных и опухолевых клетках молочной железы [28].

Прогностическое значение экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы

Прогностическое значение экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы до лечения (предшествующей МЛЮ), также как и связь с непосредственным эффектом химиотерапии неоднозначны. В исследовании Н. Burger et al. показано, что наибольший вклад в уменьшение показателей безрецидивной выживаемости больных РМЖ вносят гены *ABCB1* и *MVP*, повышенный уровень экспрессии которых ассоциирован с более высокой частотой рецидивирования и метастазирования (59 больных) [6]. Экспрессия гена *ABCC11* была обнаружена во многих опухолях и, в частности, в опухоли молочной железы, и даже предложена некоторыми авторами в качестве прогнозирующего фактора для выбора химиотерапии [22]. Исследование 104 пациенток, которым проводилась операция и адьювантное лечение, показало, что чем большее количество опухолевых клеток в операционном материале экспрессирует Р-гликопротеин, тем хуже у больных общая и безметастатическая выживаемость [44]. Повышенный уровень экспрессии гена *ABCC2* в операционном материале 70 больных без НАХТ был связан с плохой общей и безметастатической выживаемостью [34]. Исследование 516 больных РМЖ в состоянии премепаузы показало, что высокий уровень экспрессии белка *Mgp1* в операционном материале только у больных, получавших адьювантную химиотерапию (но не гормональную терапию), был связан с неблагоприятным прогнозом [16].

По данным японских авторов (43 больных РМЖ), экспрессия генов *ABCC1*, *MVP*, *ABCG1* до лечения не имеет прогностической значимости и не связана с основными клинико-морфологическими параметрами прогноза [23]. При изучении 171 больной РМЖ было показано, что экспрессия *ABCB1* и *ABCC1* в опухоли до лечения не имеет корреляций с 5-ти летней выживаемостью пациентов [35]. Ретроспективное ИГХ исследование 177 пациентов не выявило связи экспрессии Р-гликопротеина с общей и безметастатической выживаемостью, экспрессия *ABCC1* была связана с неблагоприятным прогнозом только в подгруппе больных с III степенью злокачественности [29]. ИГХ исследование белка *Mgp1* у 259 больных не показало связи с общей и безметастатической выживаемостью [36]. Другими авторами, в частности, N.S. Wind и I. Holen тоже не было показано статистически значимой

корреляции экспрессии гена *ABC1* с 5-летней безрецидивной выживаемостью [54]. Исследование экспрессии Р-гликопротеина, Mgp1 и Vsp белков в опухоли 45 больных РМЖ до предоперационной химиотерапии не выявило связи с безметастатической выживаемостью [26]. Недавние исследования на выборке из 100 больных раком молочной железы (РМЖ) указывают на отсутствие прогностической значимости генов ABC, в частности, *ABCA12*, *ABCA13*, *ABCC1*, *ABCC8*, *ABCC11* и *ABCD2* [21].

Таким образом, казавшийся очевидным тезис о том, что высокий уровень экспрессии генов ABC и их продуктов в опухолевых клетках обеспечивает устойчивость к химиопрепаратам и является неблагоприятным прогностическим фактором, в клинических исследованиях, по крайней мере, для РМЖ, до сих пор является весьма спорным. Подтверждением тому служит и неудача в разработке многочисленных ингибиторов функциональной активности белков ABC-транспортёров, клиническое изучение чего не выявило повышения чувствительности опухоли к химиотерапии и увеличения выживаемости онкологических больных [49].

Что касается связи **приобретенной МЛУ** с показателями выживаемости больных РМЖ, то такие исследования на настоящий момент единичны. N.S. Wind и T. Holen показали, что повышение экспрессии *ABCC1* в процессе лечения по антрациклин-содержащим схемам коррелировало с более низкой безрецидивной выживаемостью [54]. Экспрессия белка Vsp в опухоли 45 больных РМЖ после НАХТ коррелировала с безметастатической выживаемостью [26].

В наших исследованиях была оценена безметастатическая выживаемость в зависимости от повышения или снижения экспрессии генов ABC в опухоли молочной железы при проведении НАХТ. В это исследование были включены 106 больных. Было четко установлено (p в log-rank тесте (0,006–0,03) и по двухстороннему критерию Фишера (0,014–0,039)), что пятилетняя безметастатическая выживаемость и частота отдаленного метастазирования в группах со снижением экспрессии генов ABC (*ABC1*, *ABCC2* и *ABCG1*) в опухоли при проведении НАХТ значительно выше, чем у больных с повышением экспрессии этих генов ABC (73–78% против 50–55%), т.е. повышение экспрессии генов *ABC1*, *ABCC2* и *ABCG1* под действием химиопрепаратов является неблагоприятным, а снижение экспрессии этих генов – благоприятным прогностическим признаком [2].

Нами показано так же, что у большинства пациентов наблюдается однонаправленное изменение экспрессии пяти основных ABC-транспортёров (*ABC1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCG1* и *ABCG2*) в

процессе НАХТ в строгом соответствии с ее эффектом: снижение при хорошем ответе на НАХТ и повышение при его отсутствии. Это явление было названо градиентным феноменом. Градиентный феномен наблюдался у 80 (75%) из 106 обследованных больных. У четверти пациентов не наблюдалось однонаправленного изменения экспрессии ABC-транспортёров в соответствии с эффектом НАХТ – градиентный феномен отсутствовал. При наличии градиентного феномена пятилетняя безметастатическая выживаемость составила 73% против 39% у больных без градиентного феномена (log-rank test $p=0,0018$) [1].

Заключение

Таким образом, в настоящее время, для клинических исследований фенотипа МЛУ наибольший интерес представляет адаптивная МЛУ, характеризующаяся изменением экспрессии ABC-транспортёров в опухоли молочной железы при проведении химиотерапии и ассоциированная с непосредственным эффектом химиотерапии и исходом заболевания. В опухоли происходит активный процесс формирования фенотипа МЛУ, на который оказывают влияние факторы организма и опухоли. Исследования механизмов регуляции генов ABC-транспортёров важны с точки зрения понимания процессов формирования фенотипа множественной лекарственной устойчивости в клинических условиях и поиска путей его преодоления. Представленные данные показывают, что для управления фенотипом МЛУ необходимо регулирование экспрессии ABC-транспортёров, а не подавление активности белков ABC, как это было ранее [49], например, используя сочетание низких доз таргетных препаратов, ингибирующих внутриклеточные сигнальные пути и модулирующих экспрессию генов ABC [24] и конвенциональных лекарственных средств, которые и будут оказывать основное противоопухолевое действие.

Работа поддержана программой повышения конкурентоспособности Национального исследовательского Томского государственного университета.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М. и др. Связь безметастатической выживаемости больных раком молочной железы и вектора изменения экспрес-

- сии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли при проведении неoadъювантной химиотерапии // *Вопр. онкол.* – 2013. – Т. 59. – № 3. – С. 334-340.
3. Allen J.D., Brinkhuis R.F., van Deemter L. et al. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance // *Cancer Research.* – 2000. – Vol. 60. – N 20. – P. 5761-5766.
 4. Amiri-Kordestani L., Basseville A., Kurdziel K. et al. Targeting MDR in breast and lung cancer: Discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies // *Drug Resistance Updates.* – 2012.
 5. Atalay C., Deliloglu Gurhan I., Irkkan C., Gunduz U. Multidrug resistance in locally advanced breast cancer // *Tumour Biol.* – 2006. – Vol. 27. – N 6. – P. 309-18.
 6. Burger H., Foekens J.A., Look M.P. et al. RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response // *Clin Cancer Res.* – 2003. – Vol. 9. – N 2. – P. 827-36.
 7. Chen K.G., Sikic B.I. Molecular Pathways: Regulation and Therapeutic Implications of Multidrug Resistance // *Clinical Cancer Research.* – 2012. – Vol. 18. – N 7. – P. 1863-1869.
 8. Chevillard S., Pouillart P., Beldjord C. et al. Sequential assessment of multidrug resistance phenotype and measurement of S-phase fraction as predictive markers of breast cancer response to neoadjuvant chemotherapy // *Cancer.* – 1996. – Vol. 77. – N 2. – P. 292-300.
 9. Chintamani, Singh J.P., Mittal M.K. et al. Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer--a prospective clinical study // *World J Surg Oncol.* – 2005. – Vol. 3. – P. 61.
 10. Chintamani, Singh J.P., Mittal M.K. et al. Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer-a prospective clinical study // *World J Surg Oncol.* – 2005. – Vol. 3. – N 1. – P. 61.
 11. Clarke R., Leonessa F., Trock B. Multidrug resistance/P-glycoprotein and breast cancer: review and meta-analysis // *Semin Oncol.* – 2005. – Vol. 32. – N 6 Suppl 7. – P. S9-15.
 12. Dixon A., Bell J., Ellis I. et al. P-glycoprotein expression in locally advanced breast cancer treated by neoadjuvant chemotherapy // *British Journal of Cancer.* – 1992. – Vol. 66. – N 3. – P. 537-541.
 13. Eechoute K., Sparreboom A., Burger H. et al. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice // *Clinical Cancer Research.* – 2011. – Vol. 17. – N 3. – P. 406-415.
 14. Faneyte I.F., Kristel P.M., Maliepaard M. et al. Expression of the breast cancer resistance protein in breast cancer // *Clin Cancer Res.* – 2002. – Vol. 8. – N 4. – P. 1068-74.
 15. Faneyte I.F., Kristel P.M., van de Vijver M.J. Multidrug resistance associated genes MRP1, MRP2 and MRP3 in primary and anthracycline exposed breast cancer // *Anticancer Res.* – 2004. – Vol. 24. – N 5A. – P. 2931-9.
 16. Filipits M., Pohl G., Rudas M. et al. Clinical role of multidrug resistance protein 1 expression in chemotherapy resistance in early-stage breast cancer: the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group // *Journal of Clinical Oncology.* – 2005. – Vol. 23. – N 6. – P. 1161-1168.
 17. Gillet J.P. S.J., Bertholet V., De Longueville F. et al. Microarray expression profiling of ABC transporters in human breast cancer // *Cancer Genomics-Proteomics.* – 2006. – Vol. 3. – N 2. – P. 97-106.
 18. Gillet J.P., Gottesman M.M. Overcoming multidrug resistance in cancer: 35 years after the discovery of ABCB1 // *Drug Resist Updat.* – 2012. – Vol. 15. – N 1-2. – P. 2-4.
 19. Gottesman M.M., Ling V. The molecular basis of multidrug resistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research // *FEBS letters.* – 2006. – Vol. 580. – N 4. – P. 998-1009.
 20. Hembruff S.L., Laberge M.L., Villeneuve D.J. et al. Role of drug transporters and drug accumulation in the temporal acquisition of drug resistance // *BMC Cancer.* – 2008. – Vol. 8. – N 1. – P. 318.
 21. Hlavac V., Brynychová V., Václavíková R. et al. The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma // *Pharmacogenomics.* – 2013. – Vol. 14. – N 5. – P. 515-529.
 22. Honorat M., Mesnier A., Vendrell J. et al. ABCC11 expression is regulated by estrogen in MCF7 cells, correlated with estrogen receptor α expression in postmenopausal breast tumors and overexpressed in tamoxifen-resistant breast cancer cells // *Endocrine-related cancer.* – 2008. – Vol. 15. – N 1. – P. 125-138.
 23. Kanzaki A., Toi M., Nakayama K. et al. Expression of multidrug resistance-related transporters in human breast carcinoma // *Jpn J Cancer Res.* – 2001. – Vol. 92. – N 4. – P. 452-458.
 24. Kathawala R.J., Gupta P., Ashby C.R., Chen Z.-S. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade // *Drug Resistance Updates.* – 2015. – Vol. 18. – P. 1-17.
 25. Kerr I.D., Haider A.J., Gelissen I.C. The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty // *British journal of pharmacology.* – 2011. – Vol. 164. – N 7. – P. 1767-1779.
 26. Kim B., Fatayer H., Hanby A.M. et al. Neoadjuvant Chemotherapy Induces Expression Levels of Breast Cancer Resistance Protein That Predict Disease-Free Survival in Breast Cancer // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8. – N 5. – P. e62766.
 27. Kool M., de Haas M., Scheffer G.L. et al. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines // *Cancer Research.* – 1997. – Vol. 57. – N 16. – P. 3537-3547.
 28. Kuo M.T. Roles of multidrug resistance genes in breast cancer chemoresistance // *Adv Exp Med Biol.* – 2007. – Vol. 608. – P. 23-30.
 29. Larkin A., O'Driscoll L., Kennedy S. et al. Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study // *Int J Cancer.* – 2004. – Vol. 112. – N 2. – P. 286-294.
 30. Leonard G.D., Fojo T., Bates S.E. The role of ABC transporters in clinical practice // *The Oncologist.* – 2003. – Vol. 8. – N 5. – P. 411-424.
 31. Leonessa F., Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer // *Endocr Relat Cancer.* – 2003. – Vol. 10. – N 1. – P. 43-73.
 32. Litviakov N.V., Cherdyntseva N.V., Tsyganov M.M. 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.
 33. Lockhart A.C., Tirona R.G., Kim R.B. Pharmacogenetics of ATP-binding Cassette Transporters in Cancer and

- Chemotherapy // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2003. – Vol. 2. – N 7. – P. 685-698.
34. Maciejczyk A., Jagoda E., Wysocka T. et al. ABCC2 (MRP2, CMOAT) Localized in the nuclear envelope of breast carcinoma cells correlates with poor clinical outcome // *Pathology & Oncology Research*. – 2012. – P. 1-12.
 35. Moureau-Zabotto L., Ricci S., Lefranc J.P. et al. Prognostic impact of multidrug resistance gene expression on the management of breast cancer in the context of adjuvant therapy based on a series of 171 patients // *Br J Cancer*. – 2006. – Vol. 94. – N 4. – P. 473-480.
 36. Nooter K., de la Riviere G.B., Look M. et al. The prognostic significance of expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in primary breast cancer // *British Journal of Cancer*. – 1997. – Vol. 76. – N 4. – P. 486.
 37. Park S., Shimizu C., Shimoyama T. et al. Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients // *Breast Cancer Res Treat*. – 2006. – Vol. 99. – N 1. – P. 9-17.
 38. Pratt S., Shepard R.L., Kandasamy R.A. et al. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites // *Mol Cancer Ther*. – 2005. – Vol. 4. – N 5. – P. 855-863.
 39. Rocchi E., Khodjakov A., Volk E.L. et al. The Product of the ABC Half-Transporter Gene *ABCG2* (BCRP/MXR/ABCP) Is Expressed in the Plasma Membrane // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2000. – Vol. 271. – N 1. – P. 42-46.
 40. Rudas M., Filipits M., Taucher S. et al. Expression of MRP1, LRP and Pgp in breast carcinoma patients treated with preoperative chemotherapy // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 2003. – Vol. 81. – N 2. – P. 149-157.
 41. Schinkel A.H., Jonker J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview // *Advanced drug delivery reviews*. – 2012. – Vol. 64. – P. 138-153.
 42. Schneider J., Gonzalez-Roces S., Pollán M. et al. Expression of LRP and MDR1 in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy // *Breast Cancer Research*. – 2001. – Vol. 3. – N 3. – P. 183-191.
 43. Singh L.C., Chakraborty A., Mishra A.K. et al. Study on predictive role of AR and EGFR family genes with response to neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer in Indian women // *Med Oncol*. – 2012. – Vol. 29. – N 2. – P. 539-546.
 44. Surowiak P., Materna V., Matkowski R. et al. Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and MDR1/P-glycoprotein in invasive breast cancers and their prognostic significance // *Breast Cancer Res*. – 2005. – Vol. 7. – N 5. – P. R862-870.
 45. Szakács G., Annereau J.P., Lababidi S. et al. Predicting drug sensitivity and resistance: profiling ABC transporter genes in cancer cells // *Cancer Cell*. – 2004. – Vol. 6. – N 2. – P. 129-137.
 46. Szakacs G., Paterson J.K., Ludwig J.A. et al. Targeting multidrug resistance in cancer // *Nat Rev Drug Discov*. – 2006. – Vol. 5. – N 3. – P. 219-234.
 47. Szakacs G., Váradi A., Özvegy-Laczka C., Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox) // *Drug discovery today*. – 2008. – Vol. 13. – N 9. – P. 379-393.
 48. Szakács G., Wah K.K., Polgár O. et al. Multidrug resistance mediated by MDR-ABC transporters // *Drug Resistance in Cancer Cells*. – 2009. – P. 1-20.
 49. Tamaki A., Ierano C., Szakacs G. et al. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology // *Essays in Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50. – N 1. – P. 209-232.
 50. Trock B.J., Leonessa F., Clarke R. Multidrug resistance in breast cancer: a meta-analysis of MDR1/gp170 expression and its possible functional significance // *J Natl Cancer Inst*. – 1997. – Vol. 89. – N 13. – P. 917-931.
 51. Tusnády G.E., Sarkadi B., Simon I., Váradi A. Membrane topology of human ABC proteins // *FEBS letters*. – 2006. – Vol. 580. – N 4. – P. 1017-1022.
 52. Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold // *The EMBO journal*. – 1982. – Vol. 1. – N 8. – P. 945.
 53. Wang C.S., Larue H., Fortin A., Gariépy G., Têtu B. *mdr1* mRNA expression by RT-PCR in patients with primary breast cancer submitted to neoadjuvant therapy // *Breast Cancer Research and Treatment*. – 1997. – Vol. 45. – N 1. – P. 63-74.
 54. Wind N.S., Hølen I. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From In Vitro Models to Clinical Studies // *International Journal of Breast Cancer*. – 2011. – P. 1-12.

Потупила в редакцию 15. 07. 2015 г.

N.V.Litvyakov^{1,2}, M.M.Tsyganov^{1,2}

Clinical studies of ABC-transporters contribution to the multidrug resistance of breast cancer

¹Laboratory of Oncovirology, Tomsk Research Institute of Oncology
²Laboratory of Translational Cell and Molecular Biomedicine, National Research Tomsk State University Tomsk, Russia

This review summarizes the clinical trials of the relationship of gene expression and protein ABC-transporters in breast cancer with the response to neoadjuvant chemotherapy (NAC) and survival of patients. In a large clinical material is considered the pre-treatment multidrug resistance (MDR) and adaptive MDR, that occurs in tumor cells during chemotherapy. Association pre-treatment MDR with NAC efficiency and survival is highly variable and not well-established. In all clinical trials, adaptive MDR showed a good association with NAC efficiency and survival of patients. The own results showed that 5-year distant metastasis-free survival was 73-78% and good response to NAC in patients with a decrease in ABC- expression. The up-regulation of these genes during NAC was related to a significant decrease (up to 50-55%) in metastasis-free survival and poor response to NAC. In the development of strategies to overcome MDR phenotype it is concluded based on the submitted clinical data.

Key words: ABC-transporters, multidrug resistance, breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, survival