

Н.В. Литвяков¹, Е.Ю. Гарбуков¹, Е.М. Слонимская^{1,2}, М.М. Цыганов¹, Е.В. Денисов¹,
С.В. Вторушин^{1,2}, К.Ю. Христенко², М.В. Завьялова^{1,2}, Н.В. Чердынцева^{1,2}

СВЯЗЬ БЕЗМЕТАСТАТИЧЕСКОЙ ВЫЖИВАЕМОСТИ БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ВЕКТОРА ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В ОПУХОЛИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

¹ ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН, Томск

² Сибирский государственный медицинский университет, Томск

Обследовано 120 больных раком молочной железы (РМЖ) T₁₋₄N₀₋₃M₀, получавших комбинированное лечение, включающее 2-4 курса неoadъювантной химиотерапии (НХТ) по схемам: САХ, FAC или таксотер, операцию и 4 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC. При помощи обратнo-транскриптной количественной ПЦР в режиме реального времени оценивали экспрессию генов МЛУ (*ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*, *GSTP1*, *MVP*) в биопсийном опухолевом материале до лечения и в операционном материале после НХТ. Сравнивая уровень экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости, определяли вектор изменения (повышение или снижение) их экспрессии в процессе химиотерапии. Если при проведении НХТ опухолевая экспрессия генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* снижалась, то пятилетняя безметастатическая выживаемость таких больных составляла 73-78%. Повышение экспрессии этих генов в процессе химиотерапии приводило к значительному уменьшению (до 50-55%) безметастатической выживаемости (метод Каплана-Майера, *p* в log-rank тесте 0,006-0,03). Связь вектора изменения экспрессии генов МЛУ в процессе НХТ с безметастатической выживаемостью не зависела от размера и гистологической формы опухоли, лимфогенного метастазирования, рецепторного статуса, молекулярного подтипа и других клинико-патологических факторов прогноза. В результате исследования установлен новый потенциальный прогностический фактор – вектор изменения экспрессии генов МЛУ в опухоли молочной железы, оцениваемый при проведении НХТ. Повышение опухолевой экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* или *ABCG1* в процессе НХТ является неблагоприятным, а снижение экспрессии этих генов – благоприятным прогностическим признаком.

Ключевые слова: гены множественной лекарственной устойчивости, рак молочной же-

лезы, безметастатическая выживаемость, экспрессия генов.

Множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), обусловленная функционированием белков семейства ABC-транспортёров (ATP-Binding Cassette), осуществляющих выброс цитостатических и таргетных средств из опухолевых клеток, является основной причиной неэффективности лекарственной терапии опухолей, в том числе рака молочной железы (РМЖ) [8,20,24]. В исследованиях *in vitro* на клеточных линиях было установлено, что высокий уровень экспрессии генов МЛУ определяет устойчивость клеток к химиопрепаратам [11, 23].

С 90-х годов прошлого столетия начались исследования клинической значимости уровня экспрессии генов МЛУ. Однако, при оценке связи исходного уровня экспрессии генов МЛУ в опухоли до лечения с непосредственной эффективностью неoadъювантной химиотерапии (НХТ), клинико-морфологическими факторами прогноза (лимфогенным метастазированием, рецепторным статусом, степенью злокачественности и размером опухоли) и показателями выживаемости получены противоречивые сведения даже в пределах одной локализации, в частности, при РМЖ [24, 14]. По данным японских авторов, экспрессия генов *MRP1* (*ABCC1*), *MVP*, *BCRP1* (*ABCG1*) не имеет прогностической значимости [12]. В работе голландских ученых показано, что наибольший вклад в уменьшение показателей безметастатической выживаемости больных РМЖ вносят гены *MDR1* (*ABCB1*) и *LRP1* (*MVP*), повышенный исходный уровень экспрессии которых ассоциирован с более высокой частотой рецидивирования и метастазирования [6]. На выборке из 171 пациентки было показано, что экспрессия *MDR1* (*ABCB1*) и *MRP1* (*ABCC1*) не имеет корреляции с показателями пятилетней выживаемости пациентов [16]. Иммуногистохимическое исследование операционного материала 516 больных РМЖ, не получавших НХТ, по-

казало, что высокий уровень экспрессии белка Mpr1 (продукта гена *ABCC1*) был связан с неблагоприятным прогнозом у больных, получавших адъювантную химиотерапию [9].

Таким образом, казавшийся очевидным тезис о том, что высокий исходный уровень экспрессии генов МЛУ и их продуктов в опухолевых клетках обеспечивает и устойчивость к химиопрепаратам, и является неблагоприятным прогностическим фактором, не получил убедительных доказательств в клинических исследованиях. В наших предыдущих работах были получены оригинальные данные, свидетельствующие о том, что непосредственная эффективность НХТ ассоциирована не с исходным уровнем экспрессии генов МЛУ в опухоли, а с вектором изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ при проведении химиотерапии. У больных, для которых было зарегистрировано снижение экспрессии после НХТ по сравнению с исходным уровнем (до лечения), отмечен объективный клинический ответ, тогда как повышение экспрессии генов МЛУ в процессе химиотерапии в подавляющем большинстве случаев было связано с отсутствием непосредственного клинического эффекта [3, 15]. На основе этих данных, было высказано предположение о том, что вектор изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ в процессе НХТ может иметь прогностическое значение. Целью настоящей работы явилось исследование связи вектора изменения экспрессии генов МЛУ при проведении НХТ с безметастатической выживаемостью больных РМЖ.

Материалы и методы

Пациенты

Было обследовано 120 больных РМЖ в возрасте 28–68 лет (средний возраст $48,32 \pm 0,67$ лет) с морфологически верифицированным диагнозом, клинической стадией ПА—IIIС ($T_{1-4}N_{0-3}M_0$), получавших в 2006–2010 гг. комбинированное лечение в клиниках ФГБУ НИИ онкологии СО РАМН (г. Томск, Россия). Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской Декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.), получено разрешение локального этического комитета НИИ онкологии СО РАМН и информированное согласие пациентов. Более 85% больных имели инвазивный протоковый рак, у 74% больных размер опухоли составил 2–5 см (T_2); 62% больных были с лимфогенными метастазами. Иммуногистохимическое исследование включало оценку экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона и HER2.

Все больные, в соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy (NAC) in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [21], (т.е. только с ПА—IIIС стадиями) в неадъювантном режиме получали 2–4 курса химиотерапии по схемам FAC, SAH или монотерапию таксотером. Через 3–5 нед после НХТ проводилась операция в объеме радикальной мастэктомии, радикальной резекции или секторальной резекции с аксиллярной лимфаденэктомией, затем больным назначались 4 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC,

лучевая терапия и/или гормональное лечение по показаниям. Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ с помощью УЗИ и маммографии, которые проводили до лечения, после 2 курсов НХТ и перед операцией. Полная регрессия (100% уменьшение опухоли) отмечена у 14 больных, частичная регрессия (уменьшение объема опухоли более чем на 50%) у 58, стабилизация (снижение объема менее чем на 50% или увеличение не более, чем на 25%) у 39 и прогрессирование (увеличение объема опухоли более чем на 25%) у 9 пациентов. В исследовании использованы биопсийные опухолевые образцы (~ 10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ, а также операционный материал (~ 60 – 70 мм³) после НХТ. Образцы опухоли помещали в раствор RNeasy (Qiagen, Germany) и сохраняли при температуре -80°C (после 24-часовой инкубации при $+4^\circ\text{C}$) для дальнейшего выделения РНК.

Выделение РНК

Тотальная РНК была выделена из 120 биопсийных образцов до лечения и 106 операционных образцов этих же больных после НХТ. У 14 больных в процессе НХТ была достигнута полная морфологическая регрессия, и опухолевые клетки при морфологическом исследовании операционного материала отсутствовали. РНК выделяли с помощью набора RNeasy mini kit Plus, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany) с добавлением в раствор РНК ингибитора РНК-аз Ribolock (Fermentas, Литва). Концентрацию и чистоту выделения РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA). Концентрация РНК составила от 80 до 250 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 1,95$ – $2,05$; $A_{260}/A_{230} = 1,90$ – $2,31$. Целостность РНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA) и RIN составил 5,6 – 7,8. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Fermentas, Литва) со случайными гексануклеотидными праймерами в соответствии с инструкцией к набору.

Количественная ПЦР

Уровень экспрессии генов МЛУ: *ABCB1* (*MDR1*), *ABCC1* (*MRP1*), *ABCC2* (*MRP2*), *ABCC5* (*MRP5*), *ABCG1* (*BCRP1*), *ABCG2* (*BCRP*), *GSTP1* и *MVP* (*LRP1*) оценивали при помощи обратнотранскрипционной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) по технологии TaqMan на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia). ПЦР ставили в трех повторах в объеме 15 мкл с 2,5 ед HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) с соответствующим буфером и 50 нг кДНК. Последовательность праймеров и методика оценки относительной экспрессии генов МЛУ описана ранее [15]. В качестве результата использовался уровень экспрессии указанных генов относительно *GAPDH* и нормальной ткани молочной железы, вычисляемый по методу Pfaffl [18], и вектор изменения экспрессии каждого гена (повышение или снижение) в процессе химиотерапии, который определяли, сравнивая уровень экспрессии до лечения и после НХТ.

Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «STATISTICA 8.0» (StatSoft Inc., USA). Для проверки гипотезы о значимости различий по частоте признака использовали критерий χ^2 . Для анализа безметастатической выживаемости использовали кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера [13]. Оценка статистической значимости различий между группами производилась с помощью log-rank теста.

Таблица 1

Пятилетняя безметастатическая выживаемость в зависимости от основных клинико-патологических параметров и эффекта НХТ у больных раком молочной железы

Клинико-патологические параметры	Пятилетняя безметастатическая выживаемость, %	p-value	Количество больных с метастазами в группе, n/N (%/%)	p-value
T ₁₋₂	70	0,017	29/77 (27/73)	0,023
T ₃₋₄	37		8/6 (57/43)	
N ₀	91	0,00001	4/42 (9/91)	0,000001
N ₁₋₃	50		33/31 (52/48)	
≤45 лет	63	0,488	16/29 (36/64)	0,386
>45 лет	69		21/54 (28/72)	
Уницентрический	75	0,001	20/65 (24/76)	0,007
Мультицентрический	48		17/18 (49/51)	
ER+	72	0,108	16/45 (26/74)	0,238
ER-	60		19/33 (37/63)	
PR+	65	0,647	20/40 (33/67)	0,564
PR-	69		15/38 (28/72)	
HER2 (- или +)	70	0,437	23/60 (28/72)	0,303
HER2 (++) или (+++)	62		11/18 (38/62)	
1. Люминальный (А и В)	74	1-2=0,744	18/54 (25/75)	1-2=0,860
2. Трижды негативный	69	2-3=0,111	8/22 (27/73)	2-3=0,047
3. HER2 позитивный	44	1-3=0,018	9/7 (56/44)	1-3=0,014
Полная+частичная регрессия	71	0,211	19/53 (26/74)	0,197
Стабилизация+прогрессия	60		18/30 (38/62)	
Патоморфоз 1-2 степени	53	0,013	29/38 (43/57)	0,015
Патоморфоз 3-4 степени	83		4/21 (16/84)	
CAx+FAC	66	0,954	30/65 (32/68)	0,730
Таксотер	72		7/18 (28/72)	
Больше 2 курсов НХТ	68	0,725	26/61 (30/70)	0,715
2 курса НХТ	63		11/22 (33/67)	

Примечание: p-value — уровень статистической значимости различий между группами. Для пятилетней выживаемости р вычислялся по log-rank тесту для кривых выживаемости, для сравнения количества больных с метастазами между группами в зависимости от клинико-патологических параметров использовался критерий χ^2 ; курсивом выделены статистически значимые различия; n – количество больных с метастазами в группе; N – количество больных без метастазов в группе.

Результаты и обсуждение

Из 120 обследованных пациентов отдаленные метастазы развились у 37 (30,8%) больных в сроки 3-48 мес с момента постановки диагноза. Трехлетняя безметастатическая выживаемость пациентов составила 73%, а пятилетняя – 67%. Рецидивы в область послеоперационного рубца наблюдались у 10 (8,3%) пациентов, при этом у 8/10 (80%) пациентов с рецидивами были отмечены отдаленные метастазы.

В табл. 1 представлены данные пятилетней безметастатической выживаемости и частота гематогенных метастазов у больных РМЖ в зависимости от клинико-патологических характеристик опухолевого процесса. Безметастатическая выживаемость зависела от лимфогенного метастазирования, размера опухоли, ее гистологической формы, молекулярного подтипа, степени лекарственного патоморфоза после НХТ. Возраст, рецепторный статус, схема НХТ, эф-

фект и количество курсов НХТ не влияли на безметастатическую выживаемость. В целом, прогностическая значимость основных клинико-патологических параметров соответствует данным литературы, и самыми «сильными» прогностическими факторами явились лимфогенное метастазирование и размер опухоли [5,7,17,25].

Изучение связи исходного уровня экспрессии генов МЛУ в опухоли с безметастатической выживаемостью не выявило значимой ассоциации ни по одному из изученных генов (данные не представлены).

Во «Введении» упоминалось предположение о том, что прогностическую значимость может иметь не уровень экспрессии генов МЛУ в опухоли до лечения, а вектор изменения экспрессии (повышение или снижение) в результате проведения химиотерапии. Это предположение основано на том, что была выявлена связь вектора изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ с эффектом НХТ. В настоящей работе оценили безметастатическую выживаемость в зависимости от повышения или снижения экспрессии генов МЛУ, детектированного при проведении НХТ. В это исследование включены 106 из 120 больных, так как для 14 больных, у которых в процессе НХТ была достигнута полная морфологическая регрессия, не представлялось возможным оценить уровень экспрессии генов МЛУ в опухоли и соответственно, определить вектор его изменения. Кроме того, уже хорошо известно, что достижение полного морфологического регресса при проведении НХТ является благоприятным прогностическим фактором [25].

В табл. 2 представлена пятилетняя безметастатическая выживаемость и частота отдаленного метастазирования в группах со снижением и повышением экспрессии генов МЛУ в опухоли при проведении НХТ. По трем генам (*ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1*) был достигнут статистически значимый уровень p в log-rank тесте (0,006-0,03) для пятилетней выживаемости и по критерию χ^2 (0,01-0,046) для частоты метастазирования в группах. Кривые безметастатической выживаемости в зависимости от вектора изменения экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* представлены на рис. 1. Показатели безметастатической выживаемости оказались существенно выше у больных со снижением экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в опухоли по сравнению с пациентами, у которых было выявлено повышение экспрессии тех же генов после НХТ (73-78% против 50-55%).

Таким образом, вектор изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ при воздействии химиопрепаратов, в отличие от исходного уровня экспрессии, имеет прогностическую значимость. Повышение опухолевой экспрессии *ABCB1*,

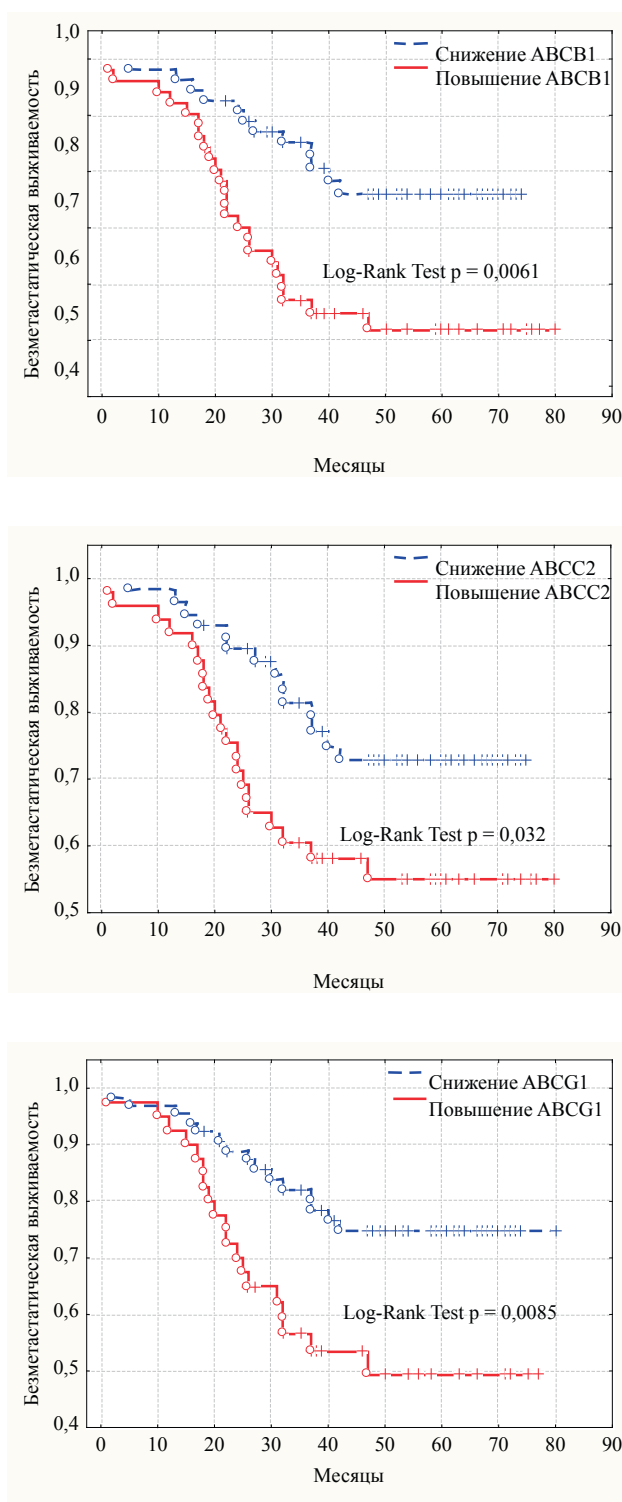


Рисунок 1. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от вектора изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ при проведении НХТ.

ABCC2 и *ABCG1* в процессе НХТ является неблагоприятным прогностическим признаком, а снижение экспрессии этих генов ассоциировано с благоприятным исходом заболевания.

Возникает закономерный вопрос, связан ли вектор изменения опухолевой экспрессии ге-

Таблица 2

Пятилетняя безметастатическая выживаемость в зависимости от направления изменения экспрессии генов МЛУ в опухоли при проведении НХТ

Экспрессия генов	Пятилетняя безметастатическая выживаемость, %	p-value	Количество больных с метастазами в группе, n/N (%/%)	p-value
ABCB1 снижение	78	0,0061	12/43 (22/78)	0,011
ABCB1 повышение	51		23/28 (45/55)	
ABCC1 снижение	71	0,159	15/40 (27/73)	0,191
ABCC1 повышение	59		20/31 (39/61)	
ABCC2 снижение	73	0,032	14/43 (25/75)	0,046
ABCC2 повышение	55		21/28 (43/57)	
ABCC5 снижение	71	0,201	14/39 (26/74)	0,208
ABCC5 повышение	60		19/31 (38/62)	
ABCG1 снижение	75	0,0085	15/49 (28/72)	0,011
ABCG1 повышение	50		19/21 (48/52)	
ABCG2 снижение	68	0,561	18/40 (31/69)	0,633
ABCG2 повышение	61		17/31 (35/65)	
GSTP1 снижение	66	0,934	18/36 (33/67)	0,944
GSTP1 повышение	64		17/35 (33/67)	
MVP снижение	67	0,879	19/44 (36/64)	0,608
MVP повышение	63		14/26 (35/65)	

Примечание: см. табл. 1

Таблица 3

Клинико-патологические параметры в группах больных РМЖ со снижением (С) и повышением (П) опухолевой экспрессии генов МЛУ при проведении НХТ

Клинико-патологические параметры	ABCB1		p-value	ABCC2		p-value	ABCG1		p-value
	С	П		С	П		С	П	
≤45 лет	19	17	0,786	21	15	0,377	23	11	0,304
>45 лет	35	35		35	35		40	30	
Пременопауза	32	30	0,870	32	30	0,766	38	22	0,502
Постменопауза	22	22		24	20		25	19	
T1-2	48	44	0,516	51	41	0,169	55	35	0,778
T3-4	6	8		5	9		8	6	
N0	21	18	0,695	20	19	0,808	23	15	0,994
N1-3	33	34		36	31		40	26	
ER+	25	29	0,308	29	25	0,879	31	22	0,707
ER-	26	20		24	22		28	17	
PR+	27	29	0,529	30	26	0,897	31	23	0,531
PR-	24	20		23	21		28	16	
HER2 (- или +)	31	40	0,095	38	33	0,634	39	31	0,187
HER2 (++) или (++++)	18	11		14	15		19	8	
Люминальный	32	32	0,880	37	27	0,140	39	24	0,960
Трижды негативный	13	11		14	10		13	11	
HER2 позитивный	9	7		5	11		10	5	
Уницентрический	44	28	0,053	43	29	0,074	44	26	0,495
Мультицентрический	14	20		14	20		19	15	
CAH+FAC	41	40	0,904	40	41	0,201	48	32	0,826
Таксотер	13	12		16	9		15	9	

Примечание: С – снижение опухолевой экспрессии гена при проведении НХТ; П – повышение опухолевой экспрессии гена при проведении НХТ; p-value – уровень статистической значимости различий по критерию χ^2 .

нов МЛУ, как потенциальный прогностический фактор, со стандартными факторами прогноза. Для ответа на этот вопрос было проведено сосоставление групп пациентов со снижением (С) и повышением (П) экспрессии генов МЛУ по основным клинко-патологическим характеристикам, которые могут вносить вклад в клиническое течение заболевания (табл. 3). Оказалось, что группы со снижением и повышением экспрессии трех генов МЛУ (*ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1*) не различаются между собой по возрасту пациенток, их менструальному статусу, а также размеру опухоли, частоте лимфогенного метастазирования, рецепторному статусу опухоли (ER, PR и HER2), частоте молекулярных подтипов, гистологической форме и схеме НХТ (табл. 3). Следует лишь отметить тенденцию к увеличению доли больных с мультицентрическим РМЖ в группах с повышением экспрессии генов *ABCB1* и *ABCC2*, но в группе с повышением экспрессии *ABCG1* такой тенденции не обнаружено. Результат анализа табл. 3 позволяет сделать достаточно обоснованный вывод о том, что вектор изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ при проведении НХТ является независимым прогностическим фактором.

Ранее мы предположили, что вектор изменения (повышение или снижение) экспрессии генов МЛУ в ответ на воздействие химиопрепаратов является отражением индивидуального паттерна регуляции генов МЛУ, свойственного конкретному пациенту и его опухоли [15]. Этот паттерн может определяться, прежде всего, генетическими и эпигенетическими механизмами регуляции экспрессии, такими как полиморфизм генов [4], метилирование ДНК, деацетилирование гистонов, активация факторов транскрипции и внутриклеточных сигналов, мутации и микроРНК, которые могут быть вовлечены в модуляцию экспрессии генов МЛУ или модуляцию процессов сплайсинга и трансляции [10, 19, 22]. Важное значение могут иметь особенности строения опухоли, определяющие феномен внутриопухолевой морфологической гетерогенности [1, 26].

Трудно объяснить, каким образом вектор изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ при проведении НХТ связан с гематогенным метастазированием. Возможно, стойкое повышение экспрессии генов МЛУ в оставшемся после НХТ опухолевом материале является всего лишь маркером такого же стойкого повышения экспрессии генов МЛУ в клетках микрометастазов, в результате чего последние оказываются малочувствительными к адьювантной химиотерапии, призванной подавлять очаги микрометастазирования [2].

Заключение

В результате исследования установлен новый информативный прогностический фактор – вектор изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ, который может быть определен при проведении НХТ. Повышение опухолевой экспрессии генов *ABCB1*, *ABCC2* и *ABCG1* в процессе неоадьювантной химиотерапии является неблагоприятным, а снижение их экспрессии – благоприятным прогностическим признаком. Новый потенциальный прогностический фактор не зависит от стандартных клинко-патологических факторов прогноза (лимфогенного метастазирования, размера опухоли молочной железы, рецепторного статуса, молекулярных подтипов, гистологической формы роста опухоли и др.). С практической точки зрения, оценка эффекта предоперационной химиотерапии в сочетании с определением вектора изменения опухолевой экспрессии генов МЛУ может, не исключено, повысить эффективность прогнозирования исхода РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Завьялова М.В., Литвяков Н.В., Гарбуков Е.Ю. и др. Взаимосвязь чувствительности опухоли к неоадьювантной химиотерапии с морфологическим строением первичного опухолевого узла при уницентрическом инфильтрирующем протоковым раке молочной железы // Сиб. онкол. журнал — 2008. — № 6. — С. 30-34.
2. Загрекова Е.И., Мещеряков А.А. Лекарственное лечение рака молочной железы // Рус. мед. журнал — 2002. — № 10. — С. 605-608.
3. Литвяков Н.В., Денисов Е.В., Гарбуков Е.Ю. и др. Экспрессия генов резистентности и маркеров химиочувствительности в опухоли молочной железы в процессе неоадьювантной химиотерапии // Сборник статей: Молекулярные и биологические технологии в медицинской практике. — 2011. — вып. 16. — С. 69-74.
4. Литвяков Н.В., Чердынцева Н.В., Цыганов М.М. и др. Ассоциация генетического полиморфизма с изменением экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в опухоли молочной железы в процессе неоадьювантной химиотерапии // Мед. генетика — 2011. — № 10. — С. 37-43.
5. Семиглазов В.Ф., Топузов Э. Э. Рак молочной железы. М.: МЕДпресс-информ, 2009. — 176 с.
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. — P. 827-836.
7. Clark G.M. Prognostic and predictive factors for breast cancer // Breast Cancer — 1995. — Vol. 2. — P. 79-89.
8. Eechoute K., Sparreboom A., Burger H. et al. Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice // Clinical Cancer Research — 2011. — Vol. 17. — P. 406-415.
9. 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 // *J. Clin. Oncol.*—2005.—Vol. 23.—P.1161-1168.
10. Glubb D.M., Innocenti F. Mechanisms of genetic regulation in gene expression: examples from drug metabolizing enzymes and transporters // *WIREs Syst Biol Med*—2011—Vol. 3.—P. 299-313.
11. 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.—P. 998-1009.
12. 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.—P. 452-458.
13. Kaplan E.L., Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations // *J. Amer. Statist. Assoc.*—1958—Vol. 53.—P. 457-481.
14. Leonessa F., Clarke R. ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. // *Endocr Relat Cancer*—2003.—Vol. 10.—P. 43-73.
15. 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 Chemother. Pharmacol.*—2013.—Vol. 71.—P. 153-163.
16. 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.—P. 473-480.
17. Perel'muter V.M., Zav'ialova M.V., Vtorushin S.V. et al. [Genetic and clinical and pathological characteristics of breast cancer in premenopausal and postmenopausal women] // *Adv Gerontol*—2008.—Vol. 21.—P. 643-653.
18. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // *Nucleic Acids Res*—2001.—Vol. 29.—P. 45.
19. Reed K., Parissenti A.M. Epigenetic Regulation of ABCB1 Transporter Expression and Function // *Current Pharmacog*—2010.—Vol. 8.—P. 218-231.
20. Schinkel A.H., Jonker J.W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview // *Advanced Drug Delivery Rev.*—2003.—Vol. 55.—P. 3-29.
21. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *The Breast Journal*—2004.—Vol.10.—P. 273-294.
22. Sharma G., Mirza S., Parshad R. et al. CpG hypomethylation of MDR1 gene in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients // *Clin Biochem*—2010.—Vol. 43.—P. 373-379.
23. 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.—P. 129-137.
24. Wind N.S., Holen I. Multidrug Resistance in Breast Cancer: From In Vitro Models to Clinical Studies // *Int. J. Breast Cancer* 2011^967419.—P. 1-12.
25. Wolmark N., Wang J., Mamounas E. et al. Preoperative chemotherapy in patients with operable breast cancer: nine-year results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18 // *JNCI Monographs*—2001.—P. 96-102.
26. Zavyalova M., Perel'muter V., Vtorushin S., et al. The presence of alveolar structures in invasive ductal NOS breast carcinoma is associated with lymph node metastasis // *Diagnost. Cytopathol.* 2013.—Vol. 41 (3).—P. 279-282.

N.V. Litviakov¹, E.Yu. Garbukov¹, E.M. Slonimskaya^{1,2}, M.M. Tsyganov¹, E.V. Denisov¹, S.V. Vtorushin^{1,2}, K.Yu. Christenko², M.V. Zavyalova^{1,2}, N.V. Cherdyntseva^{1,2}

CONNECTION OF METASTASIS-FREE SURVIVAL IN BREAST CANCER PATIENTS AND AN EXPRESSION VECTOR OF MULTIDRUG RESISTANCE GENES IN TUMOR DURING NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

¹Research Institute of Oncology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences;
²Siberian State Medical University Tomsk

Previously, we showed the association of neoadjuvant chemotherapy (NAC) response with changing the expression vector (increase or decrease) of multidrug resistance genes (MDR) in breast tumors during chemotherapy. The aim of the present study was to evaluate the relation between changes in the expression vector of MDR genes and distant metastasis-free survival. Patients (n = 120) with breast cancer (T₁₋₄N₀₋₃M₀) treated by 2-4 cycles of NAC (CAX, FAC, and taxane regimes) and 4 cycles of adjuvant chemotherapy (FAC) were included. TaqMan-based quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) was used to estimate the expression of the following MDR genes: *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCC2*, *ABCC5*, *ABCG1*, *ABCG2*, *GSTP1*, and *MVP*—in biopsies before NAC and in tumor samples after chemotherapy. Comparing the corresponding expression levels allowed us to identify the vector of expression change during NAC. The results showed that 5-year distant metastasis-free survival was 73-78% in patients with a decrease in *ABCB1*, *ABCC2*, and *ABCG1* expression. The up-regulation of these genes during NAC was related to a significant decrease (up to 50-55%) in metastasis-free survival (Kaplan-Meier analysis: log-rank p value = 0.006-0.03). The association of changing the expression vector of MDR genes with metastasis-free survival did not depend on tumor size, lymph node involvement, histological form, receptor status, molecular subtype, and others clinicopathological parameters of breast cancer. The obtained data suggest that changing the expression vector of MDR genes in breast tumors during NAC may be used as a new potential prognostic marker of breast cancer. An increase in tumor expression of *ABCB1*, *ABCC2*, and *ABCG1* during chemotherapy is a factor of poor prognosis, whereas down-regulation of these genes—a favorable prognostic marker.

Поступила в редакцию 19.04.2013