

*И.М. Коваленко<sup>1</sup>, Р.Б. Самсонов<sup>1,2</sup>, Т.А. Штам<sup>1,2,3</sup>, Е.В. Цырлина<sup>1</sup>, Р.А. Камышинский<sup>3,4</sup>, Т.Ю. Семиглазова<sup>1</sup>, Г.А. Дамян<sup>1</sup>, Л.М. Берштейн<sup>1</sup>, В.Ф. Семиглазов<sup>1</sup>, А.В. Малек<sup>1,2</sup>*

## **Экзосомальные микро-рнк — потенциальный предиктивный маркер эффекта неоадьювантной терапии рака молочной железы**

<sup>1</sup>ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург

<sup>2</sup>ООО «Онко-система», Москва

<sup>3</sup>НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Гатчина

<sup>4</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва

В понятие неоадьювантного системного лечения пациентов с раком молочной железы (РМЖ) включаются неоадьювантная химиотерапия (НХТ), неоадьювантная гормонотерапия (НГТ), неоадьювантная таргетная терапия. Тот или иной вид системной терапии чаще всего определяется уровнем экспрессии рецепторов эстрогенов/прогестерона, HER2, т.е. иммуногистохимическими характеристиками заболевания. В данной статье предлагается оценить в качестве предиктивного фактора изменение профиля экзосомальных микро-РНК для определения эффективности НХТ, включающей таксаны. Полученные результаты выявили связь между уровнем концентрации нескольких молекул микро-РНК в циркулирующих экзосомах и эффектом НХТ. Кроме того, показатель, вычисляемый как соотношение концентраций miR-34a и miR-451, позволяет предсказывать эффект таксан-содержащей НХТ. Полученные результаты подтверждают предположение о предиктивной значимости экзосомальных микро-РНК и оправдывают дальнейшие исследования с целью создания клинически применимой методики прогнозирования эффекта НХТ при раке молочной железы.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, неоадьювантная химиотерапия, экзосомы, микро-РНК, предикторы эффективности лечения

### **Введение**

Неоадьювантная (предоперационная) химиотерапия является одним из основных этапов комплексного лечения операбельного или условно операбельного рака молочной железы [35]. НХТ делает возможным оперировать ранее неоперабельные формы местно-распространенного РМЖ; в большинстве случаев результаты НХТ позволяют уменьшить размеры опухоли и оптимизировать объем оперативного вмешательства [3, 34]. В качестве первой линии химиотерапии, как правило, используются

комбинации препаратов, обладающих наибольшей активностью при РМЖ — антрациклины и таксаны, хотя до настоящего времени в клинической практике нет надежных маркеров предикции эффективности этих препаратов [14]. Поэтому в части случаев НХТ не приводит к ожидаемому клиническому эффекту: на фоне терапии размеры опухоли увеличиваются, возможности проведения органосохраняющей операции снижаются, риск диссеминации опухоли растет. В клинической практике решение о назначении и выборе режима НХТ принимается с учетом общего состояния пациентки, стадии опухолевого процесса и молекулярно-биологического подтипа опухоли [4]. Но, очевидно, эти характеристики недостаточны для надежного прогнозирования эффекта НХТ, которая для ряда пациенток оборачивается лишь долгим периодом ожидания необходимой операции. Соответственно, совершенствование принципов отбора пациенток для проведения НХТ и методов персонализированного выбора оптимальных режимов терапии является важной научной и клинической задачей.

Микро-РНК (ми-РНК) — это короткие регуляторные молекулы РНК, опосредующие контроль генной экспрессии на пост-транскрипционном уровне. Состав (профиль) внутриклеточных молекул микро-РНК отражает различные аспекты биологии как нормальных, так и опухолевых клеток [32]. В частности, устойчивость (резистентность) клеток РМЖ к определенным видам цитостатической терапии сопровождается характерными изменениями профиля микро-РНК (рис. 1) [24]. Например, формирование устойчивости клеток РМЖ к препаратам семейства таксанов сопровождается изменениями уровней экспрессии miR-451 [40] и miR-34a [27], а устойчивость клеток РМЖ к терапии тамоксифеном коррелирует с уровнем экспрессии miR-375 [42]. Данные, полученные в ходе десятков исследований с тканью опухолей и клеточных линий РМЖ (табл. 1), позволяют рассматривать изменения экспрессии ряда молекул микро-РНК как перспек-

тивные маркеры прогноза эффекта системной терапии РМЖ [11, 24].

В дополнение к внутриклеточным миРНК особый интерес представляет пул циркулирующих молекул [30]. Предполагается, что существует как минимум три фракции внеклеточной миРНК: (1) компоненты цитоплазматического комплекса RISC (RNA-induced silencing complex), включающие миРНК и белок Ago2, (2) комплексы, образованные миРНК и липопротеидами высокой плотности, и (3) миРНК в составе мембранных везикул, например, экзосом [38]. Последняя фракция образуется в результате активного и регулируемого процесса секреции микровезикул, поэтому именно экзосомальные миРНК, секретлируемые клетками РМЖ и циркулирующие в плазме, скорее всего отражают различные аспекты биологии клеток опухоли, включая чувствительность/устойчивость к различным видам цитостатической терапии [47].

Целью представленной работы являлась оценка возможной корреляции между составом экзосомальных миРНК и ответом на таксан-содержащую неоадьювантную терапию пациенток с РМЖ.

## Материалы и методы

**Пациенты.** Биологический материал был получен от 47 пациенток, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. План исследования был одобрен Локальным Этическим Комитетом, все клинические данные были деперсонализированы. Средний возраст пациенток, включенных в исследование, составил 54,5 года ( $\pm 7$  лет). Перед началом НХТ всем пациенткам был проведен стандартный комплекс диагностических исследований, включая УЗИ исследование молочных желез (с измерением размеров опухолевого узла), трепан-биопсию и ИГХ — анализ биоптата. В исследование были включены пациентки с РМЖ клинической стадии ПА (T2N0M0) и ПВ (T2N1M0, T3N0M0). С учетом данных ИГХ всем пациенткам было рекомендовано проведение таксан-содержащей неоадьювантной полихимиотерапии. После 6 циклов НХТ, оценка ее эффекта была проведена с помощью УЗИ.

**Экзосомы.** Выделение и анализ экзосом плазмы. Венозная кровь (4-6 мл) собиралась до начала НХТ в вакутейнеры с ЭДТА, плазма отделялась в течение 10 минут после забора крови, замораживалась и хранилась при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Выделение экзосом из плазмы крови проводилось с помощью латексных микрочастиц с фиксированными на поверхности антителами к экзосомальному маркеру CD63 (производства компании HansaBioMed, Эстония) в соответствии с инструкцией производителя. Для оценки физико-химических характеристик выделенные везикулы «смывали» с частиц, а для последующего выделения и анализа РНК везикулы дезинтегрировали добавлением лизис-буфера. Лазерная корреляционная спектроскопия (ЛКС) использовалась для оценки размера (гидродинамического радиуса) выделенных везикул, который рассчитывался на основе данных о коэффициенте диффузии везикул в физиологическом растворе. Измерения проводили на лазерном анализаторе Nanotrac Wave II, (Microtrac, Германия). Результат измерений представлялся в виде гистограммы распределения частиц по размерам (гистограмма фракционного состава), в которой

ось абсцисс — шкала размеров представлена в нанометрах, а по оси ординат отложен вклад в общее рассеяние образца частиц данного размера в процентах. Морфология выделенных везикул оценивалась с помощью криоэлектронной микроскопии. Исследование проводилось на просвечивающем криоэлектронном микроскопе Titan Krios 60-300 TEM/STEM (FEI, США), оснащенном высокочувствительным детектором электронов DED (Direct electron detector) Falcon II (FEI, США) и корректором сферических аберраций (CEOS, Германия). Электронно-микроскопические медные сетки, покрытые тонким слоем аморфного углерода, были гидрофилизированы в тлеющем разряде с использованием установки Pelco easiGlow. Далее, на сетки наносили 3 мкл препарата и с помощью установок Vitrobot Mark IV (FEI, США) проводили процедуру витрификации образцов в жидком этане, охлажденном до температуры жидкого азота. В результате образцы были зафиксированы в тонком слое аморфного льда, что позволило исследовать внеклеточные микровезикулы (ВМВ) в нативном состоянии. Проточную цитометрию (ПЦ) применяли для оценки наличия поверхностных белковых молекул — т.н. экзосомальных маркеров. Для этого был использован набор Ecto-FACS (HansaBioMed, Эстония), который содержит латексные микрочастицы, (4 мкм) неспецифично связывающие мембранные везикулы. Определение экзосомальных маркеров на поверхности экзосом проводили, после инкубации микрочастиц с флуоресцентно мечеными антителами: anti-CD9 и anti-CD63 (Abcam, США). Измерения проводили на аппарате CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

**МикроРНК.** Список потенциально значимых миРНК был составлен на основе анализа оригинальных исследований, представленных в базе данных PubMed ([www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov)). Учитывались работы, в которых с помощью реакции обратной транскрипции и ПЦР были показаны изменения относительной концентрации определенных миРНК после/в результате проведения химиотерапии или была показана связь между уровнем экспрессии миРНК и ответом на терапию (табл. 1). Таким образом было выбрано 22 молекулы миРНК, включая miR-21, miR-26a, miR-29b, miR-31, miR-34a, miR-106, miR-125b, miR-126a, miR-141, miR-146a, miR-146b, miR-155, miR-181a, miR-200, miR-205, miR-210, miR-214, miR-221, miR-222, miR-342. Дополнительно в исследование были включены две молекулы: miR-191 и малая ядерная РНК U6, характеризующиеся относительно стабильной концентрацией в плазме. Анализ экспрессии миРНК был проведен с помощью реакций полиаденилирования и неспецифической обратной транскрипции (всех миРНК) с последующей миРНК-специфической ПЦР в режиме реального времени с использованием специальной аналитической системы (miRCURY LNA™ Universal RT and Pick-&-Mix microRNA PCR Panels) производства компании Exiqon, Дания. Нормализация результатов проведена тремя методами: относительно т.н. референсных молекул miR-191 и U6), включенных в анализ, и относительно среднего уровня экспрессии всех анализируемых миРНК по формуле  $dCt = 2^{(Ct_{Ref} - Ct_{miR})}$ . Значения dCt усреднялись для сравнимых групп пациенток, статистическая значимость наблюдаемых различий оценивалась с помощью программы GraphPadPrizm6.

## Результаты

Оценка эффекта НХТ проводилась, как это принято в онкологической практике, хотя использование полученных данных в рамках клинических исследований представляется нетривиальной задачей. На дооперационном этапе размер опухоли может быть оценен с помощью



**Таблица 1. Молекулы миРНК, выбранные по результатам анализа литературы**

микроРНК	Материал	Источник
miR-451, -21, and -205	ткань опухоли	[5 , 40 , 45]
miR-26a	ткань опухоли, клеточные линии	[16 , 18]
miR-29b	клеточные линии	[12 , 15]
miR-31, miR-375, miR-21	ткань опухоли	[37]
miR-34a, 125b, 126a	клеточные линии	[12, 16, 27, 45]
miR-106	клеточные линии	[25]
miR-141	клеточные линии	[44]
miR-146a/miR-146b	клеточные линии	[33 , 45]
miR-155	ткань опухоли	[19]
miR-181a	клеточные линии	[41]
miR-200a	In vivo модель	[17]
miR-210	ткань опухоли	[16]
miR-214	клеточные линии	[46]
miR221/222	ткань опухоли	[12]
miR-342	ткань опухоли	[16]

**Таблица 2. Молекулы миРНК, различающиеся своей концентрацией в плазме пациенток, ответивших (sensitive) и не ответивших (resistant) на НХТ**

миРНК	Нормализованный показатель концентрации		Статистическая значимость наблюдаемой разницы U-критерий Манна-Уитни: p < 0,5 (*); p < 0,05 (**); p < 0,005 (***); p < 0,0005 (****).
	Группа 1, Sensitive (PPO <60%)	Группа 2, Resistant (PPO >60%)	
miR-34a	4,06	9,35	****
miR-451	3,10	2,12	*
miR-106	1,46	1,14	**
miR-126a	0,064	0,014	**
miR-342	0,49	0,16	***

были произвольно поделены на две группы: условно «ответивших» и «не ответивших» на терапию. В первой группе (n=26 пациенток) размер резидуальной опухоли составил <60%, во второй группе (n=21 пациентка) > 60% от размера исходного образования. При этом разница между средними для групп значениями (%) изменения размера опухоли оказалась статистически достоверной (рис. 2Б). Очевидно, что такое деление не совсем оправдано с биологической точки зрения, т.к. реакция опухоли на терапию не определяется по принципу «да/нет», а может варьировать градуально (меняясь в ту или другую сторону постепенно, небольшими «шагами»). Но описанный подход был оправдан задачей исследования, поскольку позволял оценить связь между ответом на терапию и уровнем концентрации ряда молекул миРНК в экзосомах плазмы пациентов.

Образцы плазмы (4 мл) были получены от пациенток до начала НХТ. Экзосомы были вы-

делены методом иммунопреципитации, а их физико-химические характеристики были оценены в соответствии с рекомендациями ISEV (International Society of Extracellular Vesicles) [29]. Так, средний размер (гидродинамический радиус) выделенных везикул был оценен как 161,6 нм, при этом выделенные везикулы представляли собой относительно гомогенную по размеру популяцию (рис. 3А). Единичные везикулы имели вид «пузырьков», ограниченных двухслойной мембраной (рис. 3Б), на поверхности везикул определялся один из т.н. «экзосомальных» маркеров: тетраспанин CD63 (рис. 3В). По совокупности полученных данных можно было полагать, что в анализируемых препаратах содержались преимущественно экзосомы, а не другие виды везикул или циркулирующие мультимолекулярные комплексы.

Из экзосом была выделена тотальная РНК, концентрация которой колебалась в пределах 200-600 нг/мкл. Анализ миРНК был проведен, как отмечалось, с помощью реакции универсальной (не специфической) обратной транскрипции и последующей ПЦР в режиме реального времени. В анализ были включены 22 молекулы (табл. 1). Результаты были нормализованы тремя способами (см. материалы и методы). Достоверными были признаны результаты сравнения уровней концентрации в двух исследуемых группах, полученные при всех трех вариантах нормализации. Так, для пяти молекул из 22 была показана статистически значимая разница концентрации в двух сравниваемых группах (т.е., у «ответивших» и «не ответивших» на таксансодержащую НХТ), в остальных семнадцати случаях результаты либо не отличались в двух этих группах пациенток, либо зависели от метода нормализации. Хороший ответ на терапию (группа 1, размер резидуальной опухоли <60% от исходного) сочетался с относительно низким содержанием miR-34a в составе экзосом плазмы и высоким содержанием miR-126, miR-106, miR-342, miR-451 по сравнению с группой 2 (размер резидуальной опухоли > 60%). Результаты по этим пяти молекулам, включая показатели относительного уровня экспрессии (нормализация по U6) и показатели статистической значимости различий, наблюдаемых между двумя группами образцов, представлены в табл. 2.

Перспективная цель представленного исследования — это разработка и внедрение в клиническую практику метода персонализированного подбора схемы НХТ для пациенток с РМЖ. Для достижения этой цели необходимо разработать алгоритм интерпретации результатов анализа экзосомальной миРНК в образце, полученном от конкретной пациентки. Результаты сравнения групп пациенток, полученные в рамках данного

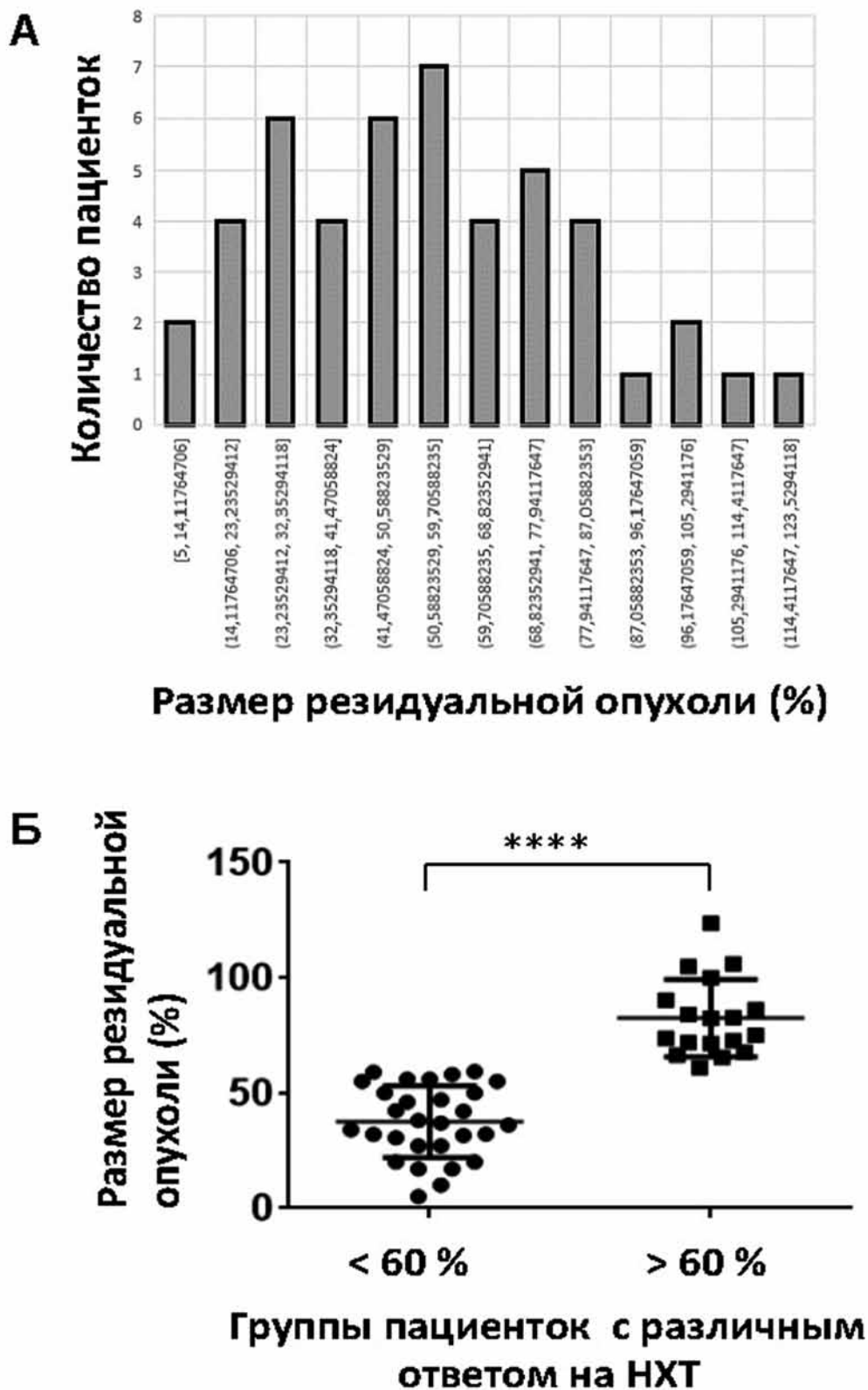


Рис. 2. Характеристики группы пациенток с РМЖ

Пациентки (n. 47) распределены в соответствии с размером резидуальной опухоли, который оценивался с помощью УЗИ после 6 циклов НХТ.

2А: Диапазон размеров резидуальной опухоли, выраженных в процентах от размеров опухоли на момент начала терапии, разделен на 13 равномерных интервалов (с «шагом» около 9%). Размер столбца отражает число пациенток с соответствующей степенью уменьшения размера опухоли

2Б: Пациентки поделены на две группы: условно «чувствительных» к НХТ (n. 29; размер резидуальной опухоли <60% от исходного, средний размер 37,6 % ± 2,897) и «не чувствительных» к НХТ (n.18; размер резидуальной опухоли > 60% от исходного, средний размер 82,52 % ± 3,964). С учетом близкого к нормальному распределению пациенток по группам с различным эффектом НХТ был применен параметрический критерий оценки статистической значимости различия между группами (непарный t –test).

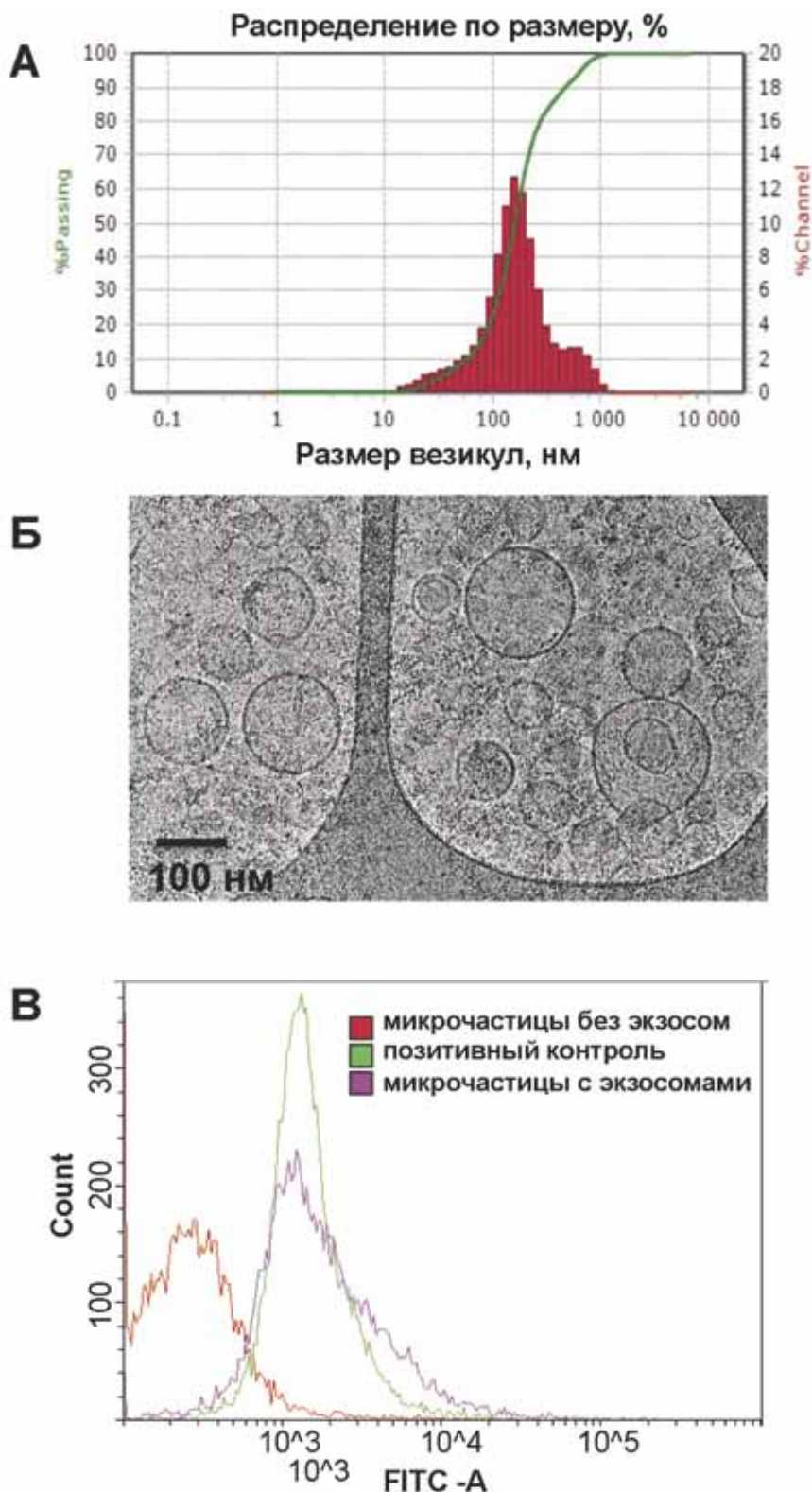


Рис. 3. Физико-химические характеристики выделенных везикул

3А: Распределение везикул по размеру определено методом лазерной корреляционной спектроскопии, позволяющим оценить гидродинамический радиус частиц в суспензии. По данным проведенных измерений, средний размер выделенных везикул составил 161,6 нм, при этом распределение по размеру имеет нормальный характер и характеризуется узким пиком.

3Б: Структура везикул оценена с помощью метода криоэлектронной микроскопии, когда суспензия везикул исследовалась в капиллярном слое жидкости при криогенной температуре (в жидком азоте). Представлено репрезентативное изображение около 20 везикул, размер которых колеблется в диапазоне 50-150 нм; везикулы ограничены характерной двуслойной мембраной.

3В: Наличие т.н. «экзосомального маркера» CD63- мембранного белка семейства тетраспанинов, участвующего в биогенезе экзосом, было оценено с помощью проточной цитометрии. Выделенные везикулы неспецифично связывались с латексными микрочастицами (диаметром 4 мкм), после этого они обрабатывались флуоресцентно-мечеными антителами (FITC-CD63). Микрочастицы без везикул (негативный контроль) детектируются как левый пик (красный), а микрочастицы с контрольными экзосомами (HansaBioMed, позитивный контроль) и микро-частицы с исследуемыми везикулами детектируются как пики со сдвигом по оси интенсивности флуоресцентного сигнала (зеленый и малиновый).

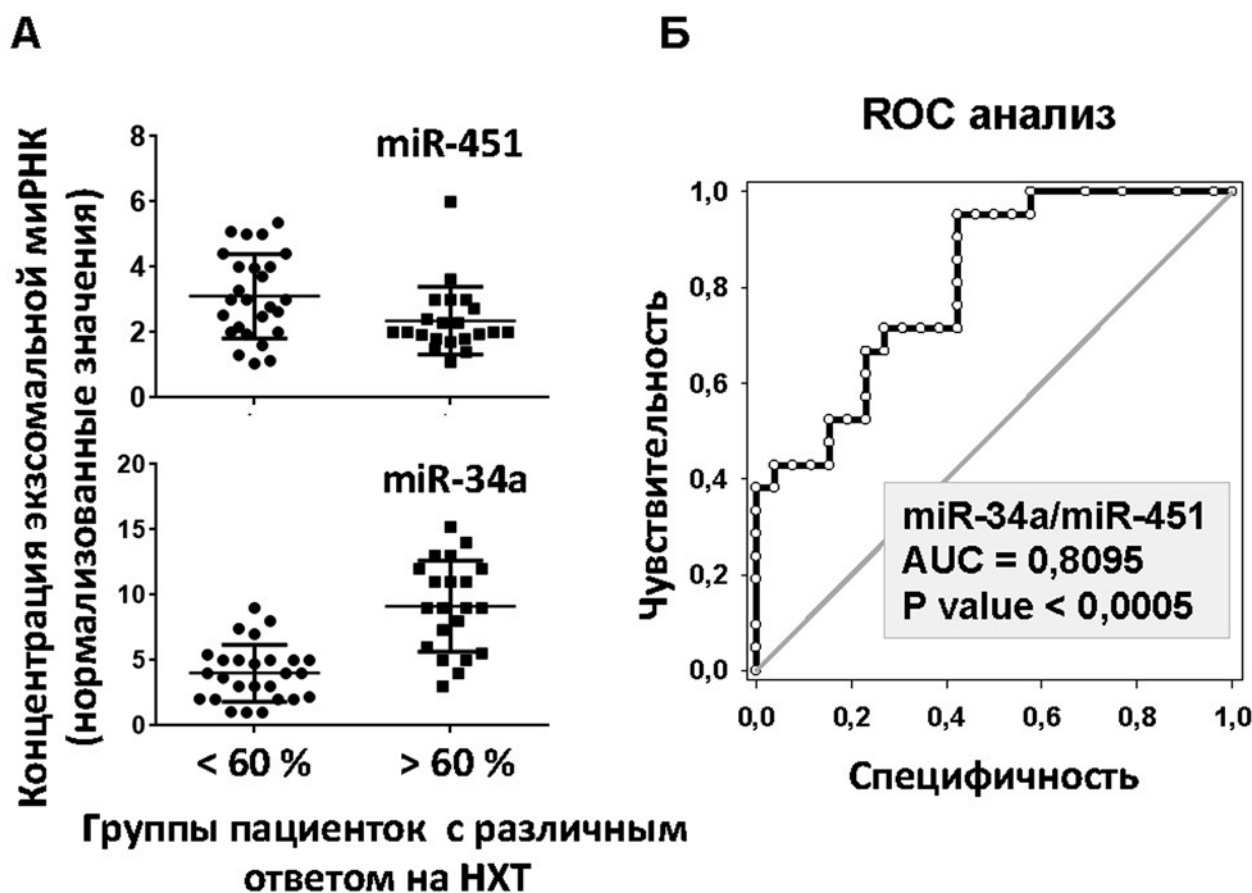


Рис. 4. Анализ концентрации экзосомальной фракции циркулирующих миРНК (miR-34a, miR-451) в плазме пациенток с РМЖ в двух группах с разным ответом на НХТ  
 4А: Репрезентативные данные, показывающие разный уровень концентрации исследуемых молекул (miR-34a, miR-451), в двух группах пациенток с различным эффектом НХТ. Представлены данные, полученные путем ОТ-ПЦР анализа и нормализованные относительно уровня экспрессии малой ядерной РНК U6).  
 4Б: Диагностическая значимость показателя, вычисленного как отношение уровней концентраций молекул miR-34a и miR-451, была оценена с помощью ROC (receiver operating characteristic) анализа.

исследования, поставленной задачи не решали. В ряде ранее опубликованных работ [1, 2] нами был предложен метод интерпретации результатов анализа миРНК в единичном образце. Этот метод основан на предположении, что изменение содержания некоторых молекул имеет реципрокный характер: активация функциональной активности / повышение концентрации одной молекулы сочетается со снижением функциональной активности/ понижением концентрации другой молекулы. Биологическая основа наблюдаемых реципрокных изменений концентрации миРНК требует дополнительных исследований, но диагностическая значимость анализа таких «реципрокных» пар была показана в цитируемых работах [1, 2]. Результаты, полученные в данном исследовании, позволяли сформировать четыре т.н. «реципрокные» пары и рассчитать значения соотношения значений  $C_t$  для таких пар. Оценка диагностической значимости этих значений была проведена с помощью ROC анализа. В одном из четырех случаев (соотношение концентраций  $miR-34a/miR-451 = 2^{miR34a-miR451}$ )

рассчитанный параметр имел статистически достоверную диагностическую значимость:  $AUC = 0,809$ ,  $p < 0,0005$  (рис. 4А и 4Б). Таким образом, оценка концентрации экзосомальных miR-34a и miR-451 могла бы служить прогностическим маркером ответа пациенток с РМЖ на таксан-содержащие схемы НХТ. Очевидно, что валидация полученных результатов на более репрезентативной выборке пациенток необходима для понимания целесообразности внедрения такого метода в клиническую практику.

### Обсуждение

К настоящему моменту предложено много способов прогнозирования эффекта химиотерапии РМЖ. Так, одним из таких методов является оценка чувствительности первичной культуры опухолевых клеток к цитостатикам *in vitro* [36]. Но это технически сложно и дорого, и, кроме того, гарантированно получить первичную культуру клеток из материала диагностической биопсии трудно, а культивация *in vitro* может изме-

нять характеристики клеток. Анализ различных характеристик опухолевых клеток, включая генетические мутации [6], особенности профиля экспрессии белок-кодирующих [22, 36] или некодирующих РНК [5], профиль экспрессии рецепторов половых гормонов (PR, ER) или ростовых факторов (HER2) может использоваться или уже используется для предсказания эффекта химиотерапии. Но как в и случае любого другого прогнозирования, перечисленные методы позволяют получить результаты вероятностного характера. Решение проблемы может быть найдено путем поиска циркулирующих в крови маркеров чувствительности РМЖ к химиотерапии и разработки методов т.н. жидкостной биопсии (liquid biopsy) [9].

В течение последних лет циркулирующие везикулы, экзосомы, привлекают особый интерес как потенциальные маркеры различных характеристик опухолевого процесса. Активно разрабатываются методы диагностики/мониторинга онкологических заболеваний на основе анализа тотальной популяции экзосом плазмы или выделения экзосом, секретлируемых опухолевыми клетками [43]. Авторами нескольких публикаций была показана диагностическая значимость экзосомальных миРНК при РМЖ [7, 23]. Связь между составом экзосомальных миРНК и реакцией клеток на цитостатическую терапию была показана в единичных исследованиях, причем, лишь на клеточных линиях [7]. Представленная работа является первой или одной из первых попыток поиска корреляций между составом экзосомальной миРНК и реакцией клеток РМЖ на химиотерапию в условиях клиники.

В рамках настоящего исследования было показано, что концентрация экзосомальной формы miR-34a снижена у пациенток, условно «чувствительных» к НХТ; изменение уровня miR-451 имело обратный (реципрокный) характер. Потенциальная роль miR-34a в формировании ответа на доцетаксел была показана для клеток РМЖ [26] и рака предстательной железы [13] в условиях *in vitro*. Роль miR-451 в формировании таксан-резистентного фенотипа клеток РМЖ исследовалась несколько глубже. Например, было показано, что трансфекция клеток паклитаксел-резистентной линии MCF-7 синтетическим аналогом miR-451 *in vitro* повышает чувствительность клеток к препарату [20]. Кроме того, введение в опухоль активной формы этой молекулы восстанавливало чувствительность клеток РМЖ к паклитакселу в модели *in vivo* [40] после того, как эта чувствительность была утрачена; а уровень miR-451 в сыворотке пациенток, резистентных к таксан-содержащей терапии, был ниже по сравнению с контрольной группой [21]. Как видно, обе молекулы (miR-34a и miR-451)

вовлечены в формирование ответа клеток РМЖ на таксан-содержащую химиотерапию, что подтверждается результатами нашего исследования. Более того, в недавнем, аналогичном по дизайну (т.е., в качестве материала для анализа использовавшем сыворотку крови) исследовании был подтвержден реципрокный характер изменения экспрессии miR-34a и miR-451 у пациенток с разным ответом на НХТ [48].

Безусловно, полученные нами данные имеют предварительный характер и основным выводом нашей работы является лишь доказательство существования корреляций между ответом пациенток с РМЖ на таксан-содержащую терапию и составом экзосомальных миРНК. Важным является использование оригинальной методики поиска и анализа молекул с «реципрокными» изменениями экспрессии — этот метод имеет перспективы клинического применения, т.к. предполагает оценку данных одного пациента (а не сравнение групп). Дальнейшие исследования будут направлены на 1) оптимизацию методики выделения экзосом, 2) расширение состава тестируемых молекул миРНК, 3) использование более представительной выборки пациентов для подтверждения полученных данных и 4) на анализ ответа опухоли на другие виды и режимы химиотерапии.

В современной клинической практике «персонализация» вопроса о назначении и выборе оптимального режима неоадьювантной химиотерапии РМЖ становится все более и более актуальной [39]. Поэтому новый метод прогнозирования эффекта НХТ имеет отчетливые перспективы практического применения именно в этой области.

#### *Источники финансирования*

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№15-54-12380) и РФФИ (№18-015-00289). Эксперименты по Криво-ЭМ проведены при поддержке РНФ (проект 17-14-01416).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Архангельская П. А., Самсонов Р. Б., Штам Т. А. и др. Оценка экспрессии 4 микроРНК в цитологических препаратах в качестве дополнительного метода диагностики рака шейки матки // Опухоли женской репродуктивной системы. — 2017. — Т. 13 (3). — С. 63-72.
2. Самсонов Р. Б., Тарасов М. А., Бурдаков В. С. и др. Диагностическое значение экзосомальных микроРНК при колоректальном раке // Колопроктология. — 2018. — Т. 2 (64). — С. 25-31.
3. Семиглазов В. Ф., Семиглазов В. В. Лечение рака молочной железы. Клинико-биологическое обоснование. Руководство для врачей. — М.: СИМК, 2017. — 277 с.
4. Стенина М. Б., Жукова Л. Г., Королева И. А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению инвазивного рака молочной железы. Злокачественные



- опухоли : Практические рекомендации RUSSCO. — 2017. — Т. 7. — С. 105-134.
5. Al-Khanbashi M., Caramuta S., Alajmi A. M. et al. Tissue and Serum miRNA Profile in Locally Advanced Breast Cancer (LABC) in Response to Neo-Adjuvant Chemotherapy (NAC) Treatment // *PLoS One*. — 2016. — Vol. 11 (4). — P. e0152032.
  6. Almeida D., Gerhard R., Leitao D. et al. Topoisomerase II-alfa gene as a predictive marker of response to anthracyclines in breast cancer // *Pathol. Res. Pract.* — 2014. — Vol. 210 (10). — P. 675-679.
  7. Bahrami A., Aledavood A., Anvari K. et al. The prognostic and therapeutic application of microRNAs in breast cancer: Tissue and circulating microRNAs // *J. Cell. Physiol.* — 2018. — Vol.233 (2). — P. 774-786.
  8. Bamal R., Chintamani, Tandon M. et al. Evaluation and Validation of Neo-Adjuvant Response Index (NRI) and It's Correlation with Various Predictive Biomarkers and RECIST in Locally Advanced Breast Cancer // *Indian J. Surg. Oncol.* — 2014. — Vol. 5 (3). — P. 171-177.
  9. Bardia A., Haber D. A. Solidifying liquid biopsies: can circulating tumor cell monitoring guide treatment selection in breast cancer? // *J. Clin. Oncol.* — 2014. — Vol.32 (31). — P. 3470-3471.
  10. Berruti A., Amoroso V., Gallo F. et al. Pathologic complete response as a potential surrogate for the clinical outcome in patients with breast cancer after neoadjuvant therapy: a meta-regression of 29 randomized prospective studies // *J. Clin. Oncol.* — 2014. — Vol. 32(34). — P. 3883-3891.
  11. Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer // *Theranostics*. — 2015. — Vol. 5 (10). — P. 1122-1143.
  12. Chen X., Lu P., Wang D. D. et al. The role of miRNAs in drug resistance and prognosis of breast cancer formalin-fixed paraffin-embedded tissues // *Gene*. — 2016. — Vol. 595 (2). — P. 221-226.
  13. Corcoran C., Rani S., O'Driscoll L. MiR-34a is an intracellular and exosomal predictive biomarker for response to docetaxel with clinical relevance to prostate cancer progression // *Prostate*. — 2014. — Vol.74 (13). — P. 1320-1334.
  14. De Iulius F., Salerno G., Taglieri L., Scarpa S. Are pharmacogenomic biomarkers an effective tool to predict taxane toxicity and outcome in breast cancer patients? Literature review // *Cancer Chemother Pharmacol.* — 2015. — Vol. 76 (4). — P. 679-690.
  15. Drago-Ferrante R., Pentimalli F., Carlisi D. et al. Suppressing role exerted by microRNA-29b-1-5p in triple negative breast cancer through SPIN1 regulation // *Oncotarget*. — 2017. — Vol. 8 (17). — P. 28939-28958.
  16. Egeland N. G., Lunde S., Jonsdottir K. et al. The Role of MicroRNAs as Predictors of Response to Tamoxifen Treatment in Breast Cancer Patients // *Int. J. Mol. Sci.* — 2015. — Vol.16 (10). — P. 24243-24275.
  17. Fischer K. R., Durrans A., Lee S. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance // *Nature*. — 2015. — Vol. 527 (7579). — P. 472-476.
  18. Gao J., Li L., Wu M. et al. MiR-26a inhibits proliferation and migration of breast cancer through repression of MCL-1 // *PLoS One*. — 2013. — Vol. 8 (6). — e65138.
  19. Gasparini P., Cascione L., Fassan M. et al. MicroRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers // *Oncotarget*. — 2014. — Vol.5 (5). — P. 1174-1184.
  20. Gu X., Li J. Y., Guo J. et al. Influence of MiR-451 on Drug Resistances of Paclitaxel-Resistant Breast Cancer Cell Line // *Med. Sci. Monit.* — 2015. — Vol.21. — P. 3291-3297.
  21. Gu X., Xue J. Q., Han S. J. et al. Circulating microRNA-451 as a predictor of resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer // *Cancer Biomark.* — 2016. — Vol.16 (3). — P. 395-403.
  22. Guler E. N. Gene Expression Profiling in Breast Cancer and Its Effect on Therapy Selection in Early-Stage Breast Cancer // *Eur. J. Breast. Health*. — 2017. — Vol. 13(4). — P. 168-174.
  23. Hannafon B. N., Trigos Y. D., Calloway C. L. et al. Plasma exosome microRNAs are indicative of breast cancer // *Breast Cancer Res.* — 2016. — Vol. 18 (1). — P. 90.
  24. Hu W., Tan C., He Y. et al. Functional miRNAs in breast cancer drug resistance // *Onco Targets Ther.* — 2018. — Vol. 11. — P. 1529-1541.
  25. Hu Y., Li K., Asaduzzaman M. et al. MiR-106b~25 cluster regulates multidrug resistance in an ABC transporter-independent manner via downregulation of EP300 // *Oncol. Rep.* — 2016. — Vol. 35 (2). — P. 1170-1178.
  26. Kastl L., Brown I., Schofield A. C. Effects of decitabine on the expression of selected endogenous control genes in human breast cancer cells // *Mol. Cell. Probes*. — 2010. — Vol.24 (2). — P. 87-92.
  27. Kastl L., Brown I., Schofield A. C. MiRNA-34a is associated with docetaxel resistance in human breast cancer cells // *Breast Cancer Res Treat.* — 2012. — Vol.131 (2). — P. 445-454.
  28. Korn E. L., Sachs M. C., McShane L. M. Statistical controversies in clinical research: assessing pathologic complete response as a trial-level surrogate end point for early-stage breast cancer // *Ann Oncol.* — 2016. — Vol. 27(1). — P. 10-15.
  29. Lotvall J., Hill A. F., Hochberg F. et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles // *J. Extracell. Vesicles*. — 2014. — Vol. 3. — e 26913.
  30. Makarova J.A., Shkurnikov M.U., Wicklein D. et al. Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role // *Prog. Histochem. Cytochem.* — 2016. — Vol.51 (3). — P. 33-49.
  31. Mukherjee P., Sharma S., Sheikh Z.A., Vijaykumar D.K. Correlation of clinico-pathologic and radiologic parameters of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer // *Indian J. Cancer*. — 2014. — Vol. 51 (1). — P. 25-29.
  32. Peng Y., Croce C. M. The role of MicroRNAs in human cancer // *Signal. Transduct. Target. Ther.* — 2016. — Vol. 1. — e 15004.
  33. Phuong N.T., Kim S.K., Im J.H. et al. Induction of methionine adenosyltransferase 2A in tamoxifen-resistant breast cancer cells // *Oncotarget*. — 2016. — Vol. 7 (12). — P. 13902-13916.
  34. Quinlan C., Uyeda J. W. Patient-Friendly Summary of the ACR Appropriateness Criteria: Monitoring Response to Neoadjuvant Systemic Therapy for Breast Cancer // *J. Am. Coll. Radiol.* — 2018. — Vol. 15 (7). — e11.

35. Semiglazov V. F., Semiglazov V. V. Neoadjuvant (Preoperative) therapy in Breast Cancer. Neoadjuvant Chemotherapy. — Croatia.: INTECH, 2012. — 22 p.
36. Singer C. F., Klinglmueller F., Stratmann R. et al. Response prediction to neoadjuvant chemotherapy: comparison between pre-therapeutic gene expression profiles and in vitro chemosensitivity assay // PLoS One. — 2013. — Vol.8 (6). — e66573.
37. Sun G., Sun L., Liu Y. et al. Her-2 expression regulated by downregulation of miR-9 and which affects chemotherapeutic effect in breast cancer // Cancer Gene Ther. — 2017. — Vol. 24 (5). — P. 194-202.
38. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA // Nucleic Acids Res. — 2011. — Vol. 39 (16). — P. 7223-7233.
39. Vaidya J.S., Massarut S., Vaidya H.J. et al. Rethinking neoadjuvant chemotherapy for breast cancer // BMJ. — 2018. — Vol. 360. — j5913.
40. Wang W., Zhang L., Wang Y. et al. Involvement of miR-451 in resistance to paclitaxel by regulating YWHAZ in breast cancer // Cell Death Dis. — 2017. — Vol. 8 (10). — e3071.
41. Wang Y., Yu Y., Tsuyada A. et al. Transforming growth factor-beta regulates the sphere-initiating stem cell-like feature in breast cancer through miRNA-181 and ATM // Oncogene. — 2011. — Vol. 30 (12). — P. 1470-1480.
42. Ward A., Balwierz A., Zhang J. D. et al. Re-expression of microRNA-375 reverses both tamoxifen resistance and accompanying EMT-like properties in breast cancer // Oncogene. — 2013. — Vol. 32 (9). — P. 1173-1182.
43. Whiteside T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring // Expert. Rev. Mol. Diagn. — 2015. — Vol. 15 (10). — P. 1293-1310.
44. Yao Y.S., Qiu W.S., Yao R.Y. et al. MiR-141 confers docetaxel chemoresistance of breast cancer cells via regulation of EIF4E expression // Oncol. Rep. — 2015. — Vol. 33 (5). — P. 2504-2512.
45. Ye P., Fang C., Zeng H. et al. Differential microRNA expression profiles in tamoxifen-resistant human breast cancer cell lines induced by two methods // Oncol. Lett. — 2018. — Vol. 15 (3). — P. 3532-3539.
46. Yu X., Luo A., Liu Y. et al. MiR-214 increases the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen and fulvestrant through inhibition of autophagy // Mol. Cancer. — 2015. — Vol. 14. — P. 208.
47. Zhong S., Chen X., Wang D. et al. MicroRNA expression profiles of drug-resistance breast cancer cells and their exosomes // Oncotarget. — 2016. — Vol. 7 (15). — P. 19601-19609.
48. Zhu W., Liu M., Fan Y. et al. Dynamics of circulating microRNAs as a novel indicator of clinical response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer // Cancer Med. — 2018. — P. 1-14.

*I.M. Kovalenko<sup>1</sup>, R.B. Samsonov<sup>1, 2</sup>, T.A. Shtam<sup>1,2,3</sup>, E.V. Tsyrlina<sup>1</sup>, R.A. Kamyshinsky<sup>3,4</sup>, T.Y. Semiglazova<sup>1</sup>, G.A. Dashyan<sup>1</sup>, L.M. Berstein<sup>1</sup>, V.F. Semiglazov<sup>1</sup>, A.V. Malek<sup>1,2</sup>*

### **Exosomal micro-rna — potential predictive marker of breast cancer neoadjuvant therapy effect**

<sup>1</sup>N.N.Petrov National Medical Research Center of Oncology, St.Petersburg

<sup>2</sup>«Oncosystem» Ltd, Moscow

<sup>3</sup>Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P.Konstantinov of National Research Center «Kurchatov Institute», Gatchina

<sup>4</sup>National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow

Neoadjuvant systemic treatment of patients with breast cancer (BC) may include neoadjuvant chemotherapy (NHT), neoadjuvant hormone therapy (NGT), neoadjuvant targeted therapy. The type of systemic therapy is determined by the level of expression of estrogen/progesterone receptors, HER2, i.e. immunohistochemical characteristic of the disease. In this article, we evaluated the predictive value of the profile of plasma exosomal microRNA, assessing the immediate efficacy of NHT, which included taxanes. Obtained results revealed a correlation between the level of concentration of several miRNA molecules in circulating exosomes and the effect of NHT. Furthermore, the index calculated as the ratio of miR-34a and miR-451 concentrations, allowed to predict the effect of taxane-containing NHT. The results confirm the assumption on the predictive significance of exosomal miRNA. Further research is needed to confirm the validity of a new method of prediction of the NHT efficacy in breast cancer.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, exosomes, miRNA, predictors of effectiveness

Поступила в редакцию 25.05.2018 г.