

М.М. Цыганов, М.К. Ибрагимова, И.В. Дерюшева, Е.Ю. Гарбуков, П.В. Казанцева,
А.М. Певзнер, Е.М. Слонимская, Н.В. Литвяков

Прогностическая значимость экспрессии гена *BRCA1* у больных раком молочной железы

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр
Российской академии наук,
Томск

Актуальность. В настоящее время при выборе тактики лечения особое положение стал занимать *BRCA*-ассоциированный рак молочной железы, хотя изначально лекарственное лечение таких пациентов немногим отличалось от терапии спорадического заболевания. Особый интерес сейчас представляет оценка дефицита гомологичной рекомбинации, который может включать в себя различные дисфункции гена *BRCA1*. При чем показано, что снижение функциональной активности *BRCA1* имеет отражение в чувствительности опухоли к ДНК-повреждающим агентам, а прогноз заболевания становится более благоприятным.

Цель работы: оценка связи экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с прогнозом заболевания.

Материалы и методы. В исследование включены 111 больных раком молочной железы T1-4N0-3M0 (IIA–IIIB стадии), с морфологически верифицированным диагнозом. Оценена начальная и послеоперационная экспрессия *BRCA1* в опухолевом материале. Из опухолевого материала до лечения и после НХТ выделяли РНК. Уровень экспрессии *BRCA1* оценивали при помощи обратнотранскриптной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR).

Результаты. В ходе проведенного исследования были оценены отдаленные результаты лечения пациентов в зависимости от уровня экспрессии гена *BRCA1*. Установлено, что наличие гипоэкспрессии *BRCA1* (уровень менее 1) в опухолевой ткани после НХТ является благоприятным прогностическим фактором и сопряжен с высокими показателями безметастатической выживаемости выживаемости ($p=0,0002$). Кроме этого, аналогичный результат показан для пациентов, пролеченных по схеме НХТ FAC ($p=0,005$). Заслуживающий внимание результат продемонстрирован для 8 больных, у которых проводилась химиотерапия с включением препаратов платины. У

всех пациентов наблюдались низкий послеоперационный уровень экспрессии *BRCA1* и 100% безметастатическая и общая выживаемость.

Выводы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о прогностической значимости экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы после неoadьювантной химиотерапии.

Ключевые слова: рак молочной железы; *BRCA1*; экспрессия; безметастатическая выживаемость; прогноз; дефицит гомологичной рекомбинации

Введение

В настоящее время определение наличия герминальных мутаций гена *BRCA1* у больных раком молочной железы (РМЖ) и раком яичников (РЯ) является неотъемлемой частью лечения пациентов с этими злокачественными образованиями. При этом, полученная информация позволяет обеспечить своевременные мероприятия по диагностике и профилактике заболевания. Кроме этого, установлено, что *BRCA1*-ассоциированный РМЖ в отличие от спорадического показывает высокую чувствительность к препаратам платины и *PARP*-ингибиторам, что делает возможным индивидуализацию выбора лекарственной терапии на основе молекулярно-генетических характеристик опухоли [1].

Важно отметить, что наличие герминальных мутаций определяет не только схему химиотерапевтического лечения, но и прогноз заболевания. Так, мета-анализ 2015 года показал, что больные раком яичника с мутацией *BRCA1* имели более высокие показатели общей и безрецидивной выживаемости по сравнению с контрольной группой, тогда как при раке молочной железы был продемонстрирован обратный результат: носительство мутации ассоциировалось с худшим прогнозом заболевания [2]. В одном из последних исследований также было показано, что если при лечении пациентов с опухолью

Таблица 1. Клинико-морфологические параметры обследованных больных РМЖ

Клинико-морфологический параметр		Число больных (абс. ч., %)
Возраст (лет)	≤45	38 (34,2%)
	>45	73 (65,8%)
Размер опухоли	T1	14 (12,6%)
	T2	82 (73,9%)
	T3	7 (6,3%)
	T4	8 (7,2%)
Лимфогенное метастазирование	N0	44 (39,6%)
	N1	47 (42,3%)
	N2	10 (9,0%)
	N3	10 (9,0%)
Молекулярный подтип	Люминальный В	78 (70,3%)
	Трижды негативный	12 (10,8%)
	HER2-позитивный	21 (18,9%)
Схема НХТ	CAX	28 (25,2%)
	FAC	45 (40,9%)
	Таксотер	30 (27,0%)
	CP	8 (7,2%)
Ответ на НХТ	Прогрессирование	12 (10,8%)
	Стабилизация	34 (30,6%)
	Частичная регрессия	57 (51,4%)
	Полная регрессия	8 (7,2%)

молочной железы после неoadъювантной химиотерапии происходят реверсивные мутации генов *BRCA1* и *BRCA2* в опухоли, то это сопряжено с плохим ответом на химиотерапию, развитием ранних рецидивов и смертью [3]. Таким образом, высокая прогностическая значимость наличия мутации *BRCA1* при РМЖ и РЯ указывает на поиск новых мишеней в широком спектре онкологических нозологий. Большой интерес представляет оценка дефицита гомологичной рекомбинации, который может включать в себя различные дисфункции гена *BRCA1*, такие как снижение экспрессии, развитие аллельного дисбаланса, делеция данного гена, потеря гетерозиготности, генетическая нестабильность опухоли и т.д. [4]. В результате дефицита гомологичной рекомбинации опухоль становится чрезвычайно чувствительной к ДНК-повреждающим агентам, а прогноз заболевания становится более благоприятным [5]. Таким образом определение дисфункции гена *BRCA1* в опухоли молочной железы может быть использовано в качестве потенциального биомаркера чувствительности химиотерапии и прогноза заболевания. Целью

исследования является оценка связи экспрессии гена *BRCA1* в опухоли молочной железы с прогнозом заболевания.

Материалы и методы

В исследование включены 111 больных РМЖ T₁₋₄N₀₋₃M₀ (IIA–IIIB стадии), с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 25–68 лет (средний возраст 48,0±0,87 лет (Mean±SE)), получавшие лечение в клинике НИИ онкологии Томского НИМЦ в период с 2006 по 2018 гг. (табл. 1). В соответствии с «Consensus Conference on neoadjuvant chemotherapy in carcinoma of the breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [6] все больные получали 2–8 курсов неoadъювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), CAX (циклофосфан, доксорубин, кселода), CP (циклофосфан, цисплатин) и монотерапию таксотером. Через 3–5 недель после НХТ проводилась операция, затем больным проводили 2 курса адъювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.), получено разрешение локального этического комитета НИИ онкологии Томского НИМЦ (протокол №1, от 14 января 2013 года). Всеми пациентами было подписано информированное согласие.

В качестве исследуемого материала, были 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 RNAlater (Ambion, USA) и сохраняли при температуре –80°C (после 24-часовой инкубации при +4°C) для дальнейшего выделения РНК.

Выделение РНК

Тотальная РНК была выделена из 111 парных образцов опухоли до лечения и после НХТ с использованием набора RNeasy mini kit Plus, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Germany) с добавлением в раствор РНК ингибитора РНК-аз Ribolock (Fermentas, Lithuania). Концентрацию и чистоту выделения РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) (125-210 нг/мкл, A_{260/A280}=1,85-1,95; A_{260/A230}=1,80-2,00). RIN составил 7,6–8,0. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Thermo Fisher Scientific) со случайными гексануклеотидами.

Количественная ПЦР

Уровень экспрессии гена *BRCA1* (PubMed NM_007294.3) оценивали при помощи обратнo-транскриптазной количественной ПЦР в режиме реального времени (RT-qPCR) с оригинальными праймерами и зондами по технологии TaqMan (*Forward primer* 5'-acagctgtgtgctctctgtg-3'; *Reverse primer* 5'-cattgtcctctgtccagcatc-3'; *Probe* FAM-5'-catcattcaccttgccacaggtgt-3'- BHQ1; Amplicon 107 bp) на амплификаторе Rotor-Gene-6000 (Corbett Research, Australia). ПЦР ставился в трех репликах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Tris-HCl pH 8,8 при 25°C, 16,6 мМ(NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94°C, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1 шаг 94°C, 10 сек и 2 шаг 20 сек – при температуре 60°C. В качестве гена-рефери использовались два гена рефери: *GAPDH* (glyceraldehydes-3-phosphatedehydrogenase) и *ACTB* (actin beta), уровень экспрессии гена *BRCA1* нормализовался по отношению к экспрессии генов-рефери и измерялся в условных единицах. Относительная экспрессия оценивалась с помощью метода Pfaffl [7]. В качестве калибратора использовалась пулированная от 20 пациентов РНК, выделенная из нормальной ткани молочной железы, полученной во время операции от больных, которым не проводилась НХТ. Согласно формуле, уровень экспрессии в нормальной ткани принимался за единицу.

Статистические методы

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ «Statistica 8.0» (StatSoft Inc., USA). Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием принятых методов параметрической и непараметрической статистики. Определение нормальности распределения осуществлялось по критерию Шапиро-Уилка. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий Вилкоксона-Манна-Уит-

ни. Вычисляли средние показатели и стандартные ошибки относительных величин. Для анализа общей (ОВ) и безметастатической выживаемости (БМВ) использовались кривые выживаемости, построенные по методу Каплана-Майера.

Результаты

В общей группе из 111 обследованных пациентов отдаленные метастазы развились у 38 (34%) больных в сроки 4–122 мес. от момента постановки диагноза. Однолетняя безметастатическая выживаемость составила 97,2%, 2-летняя – 82,6%, 5-летняя – 68,8%.

Сравнение показателей экспрессии гена *BRCA1* в опухоли до лечения и после НХТ у больных с наличием гематогенных метастазов по сравнению с группой без метастазов показало статистически значимые различия в послеоперационном уровне экспрессии данного гена (табл. 2).

Для выявления связи показателей экспрессии *BRCA1* с выживаемостью мы воспользовались статистическими характеристиками нашей выборки по уровню экспрессии *BRCA1*. В результате было получено две группы анализа: пациенты с гиперэкспрессией гена *BRCA1* (экспрессия более 1) и группа гипоекспрессии (экспрессия менее 1). Далее с использованием метода Каплана-Майера было показано, что при гипоекспрессии *BRCA1* в опухоли молочной после НХТ показатель безметастатической выживаемости статистически значимо выше (log-rank test p=0,0002), по сравнению с группой пациентов, у которых наблюдался уровень экспрессии более 1 (рис. 1).

Статистически значимых различий в показателях ОВ у пациентов с гипер и гипоекспрессией гена *BRCA1* как до лечения, так и после НХТ установлено не было (log-rank test p=0,131 и p=0,816, соответственно).

Следующим этапом работы явился анализ показателей ОВ и БМВ в зависимости от уровня экспрессии исследуемого гена и схемы НХТ. С начальным уровнем экспрессии *BRCA1* статистически значимых различий в показателях ОВ и БМВ установлено не было. Но, было показано, аналогично предыдущему результату, что наличие гиперэкспрессии в опухоли молочной железы после НХТ сопряжено с низкими показателями безметастатической выживаемости у

Таблица 2. Уровень экспрессии BRCA1 в опухоли до и после НХТ в зависимости от наличия гематогенных метастазов

Экспрессия	Гематогенные метастазы и рецидивы		
	Наличие (n=38)	Отсутствие (n=73)	p-value
BRCA1 до лечения	0,863±0,136	0,980±0,13	0,875
BRCA1 после НХТ	1,181±0,213	0,512±0,061	0,011

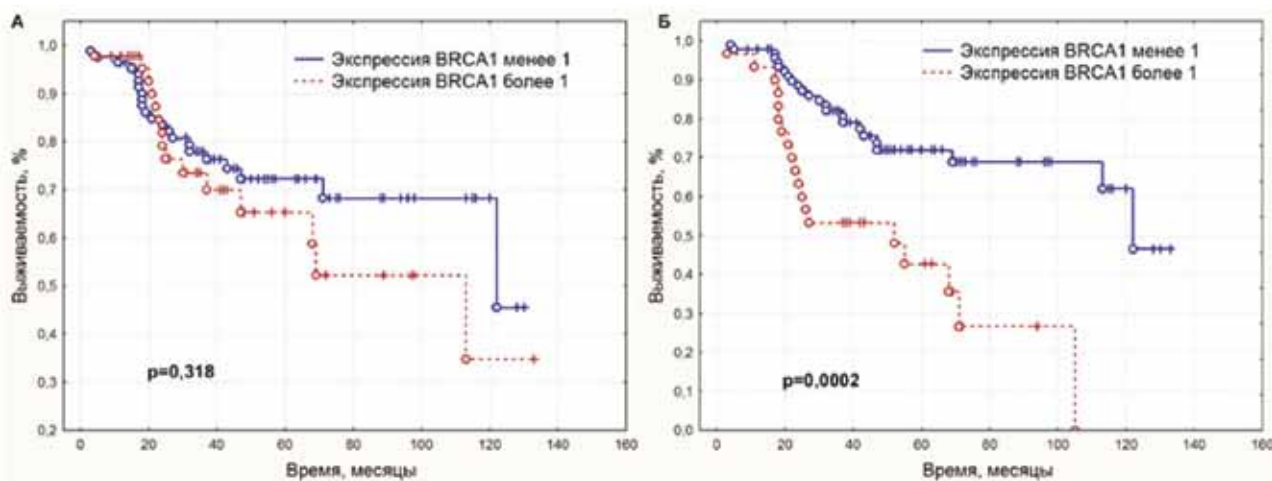


Рис. 1. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от уровня экспрессии в опухоли до (А) и после НХТ (Б) гена BRCA1

пациентов, пролеченных по схеме FAC (log-rank test $p=0,005$) и САХ (на уровне выраженной тенденции, $p=0,08$) (рис. 2).

Показатель 5-летней БМВ у группы пациентов со схемой неoadъювантной химиотерапии FAC и уровнем BRCA1 менее 1, составил 67% против 34% у пациентов с гиперэкспрессией исследуемого гена.

Наши результаты не показали статистически достоверной связи уровня экспрессии гена BRCA1 с общей и безметастатической выживаемостью у пациентов, получавших таксотер (log-rank test $p=0,226$ и $p=0,805$, соответственно).

Интересный результат был получен для пациентов, получавшим НХТ с включением препаратов платины. Помимо того, что у 7 из 8

больных наблюдался объективный ответ на НХТ (полная и частичная регрессия), все пациенты имели 100% 2-летнюю безметастатическую и общую выживаемость.

Обсуждение

В недавнем исследовании на нейроэндокринных опухолях желудочно-кишечного тракта была показана связь экспрессии BRCA1 с прогнозом заболевания [8]. Авторами было установлено, что низкая экспрессия BRCA1 (менее 2) сопряжена с более высокими показателя безрецидивной ($p<0,05$) выживаемости по сравнению с группой больных, у которых экспрессия была выше 2.

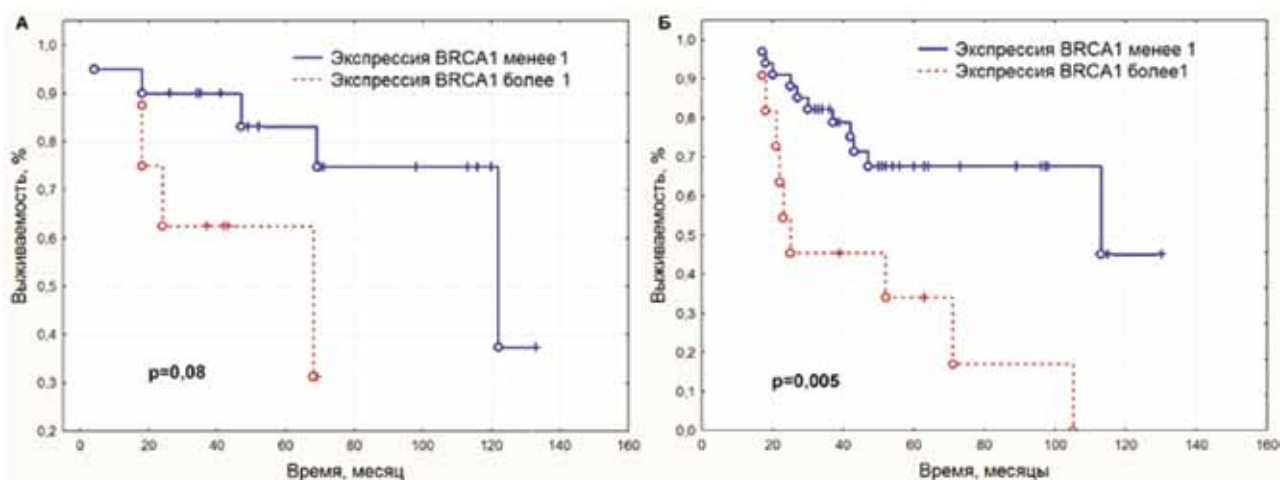


Рис. 2. Безметастатическая выживаемость больных РМЖ в зависимости от послеоперационного уровня экспрессии BRCA1 в опухоли пролеченных по схемам САХ (А) и FAC (Б)

Важно отметить, что так как BRCA-ассоциированные опухоли развиваются преимущественно за счет повреждений, связанных с системой репарации, двуцепочечных разрывов и сшивок ДНК, то применение противоопухолевых препаратов, вызывающих подобные повреждения (в частности, препараты платины), могут оказаться высокоэффективными, а следовательно влиять и на отдаленные результаты лечения. Положительный эффект такого лечения был показан в основном для наследственного РМЖ и РЯ [9]. Некоторые авторы указывают, что отсутствие экспрессии BRCA1 является независимым предиктором низких показателей безрецидивной выживаемости у пациентов, получавших химиотерапию на основе таксанов [10].

Полученные нами данные согласуются с данными литературы, в исследовании 2018 года на РЯ было установлено, что низкая экспрессия BRCA1 является благоприятным прогностическим фактором для ОВ ($p=0,028$), [11], как и при РМЖ; низкая экспрессия белка BRCA1 коррелирует с благоприятным исходом заболевания [12].

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что гиперэкспрессия гена BRCA1 в опухолевой ткани молочной железы после неoadъювантной химиотерапии является неблагоприятным прогностическим фактором и может быть использована в качестве маркера прогноза заболевания. Стоит обратить внимание, что наибольшие показатели безметастатической выживаемости характерны для групп пациентов, получавших в неадъювантной режиме химиотерапию по схеме FAC и CP. На сегодняшний день, целесообразным представляется дальнейшее изучение предиктивной и прогностической значимости не только экспрессии гена BRCA1, но и других его параметров в опухоли молочной железы.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках конкурса 2018-2020 года на получение стипендии Президента РФ молодым ученым и аспирантам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Имянитов Е.Н. Молекулярная диагностика в онкологии // Вопросы онкологии. – 2012. – 58. – С. 153-163.
2. Zhong Q., Peng H.L., Zhao X. et al. Effects of BRCA1-and BRCA2-related mutations on ovarian and breast cancer survival: a meta-analysis // Clinical Cancer Research. – 2015. – Vol. 21. – P. 211-220. – doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1816.
3. Afghahi A., Timms K.M., Vinayak S. et al. Tumor BRCA1 reversion mutation arising during neoadjuvant platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer is associated with therapy resistance // Clinical Cancer Research. – 2017. – Vol. 1. – P. 1-26. – doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2174.
4. Gerrata L., Fanotto V., Pelizzari G. et al. Do platinum salts fit all triple negative breast cancers? // Cancer treatment reviews. – 2016. – Vol. 48. – P. 34-41. – https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.06.004.
5. McCabe N., Turner N.C., Lord C.J. et al. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibition // Cancer research. – 2006. – Vol. 66. – P. 8109-8115. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0140.
6. 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. – https://doi.org/10.1111/j.1075-122X.2004.21594.x.
7. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR // Nucleic acids research. – 2001. – Vol. 29. – P. 45. – https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45.
8. Гафтон И.Г., Имянитов Е.Н., Семиглазов В.В. и др. Экспрессия гена BRCA1 при нейроэндокринных опухолях желудочно-кишечного тракта // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – Т. 16. – С. 11-15.
9. Имянитов Е.Н., Моисеенко В.М. Drug therapy for hereditary cancers // Hereditary cancer in clinical practice. – 2011. – Vol. 9. – P. 1-16. – https://doi.org/10.1186/1897-4287-9-5.
10. Kurebayashi J., Yamamoto Y., Kurosumi M. et al. Loss of BRCA1 expression may predict shorter time-to-progression in metastatic breast cancer patients treated with taxanes // Anticancer research. – 2006. – Vol. 26. – P. 695-701.
11. Tsubulak I., Shivalingaiah G., Wenzel S. et al. Clinical impact of BRCA1 and BRCA2 mRNA expression in ovarian cancer // American Society of Clinical Oncology. – 2018. – Vol. 36. – e17533. – doi: 10.1200/JCO.2018.36.15_suppl.e17533.
12. Nomura H., Kataoka F., Aoki D. et al. Expression of potential biomarkers associated with homologous recombination repair in patients with ovarian or triple-negative breast cancer // Cancer Biomarkers. – 2016. – Vol. 16. – P. 145-152. – doi: 10.3233/CBM-150550.

Поступила в редакцию 25.01.2019 г.

*M.M. Tsyganov, M.K. Ibragimova, I.V. Deryusheva,
E.Yu. Garbukov, P.V. Kazantseva, A.M. Pevsner,
E.M. Slonimskaya, N.V. Litviakov*

The prognostic significance of *BRCA1* gene expression in patients with breast cancer

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk

Abstract. Nowadays, *BRCA*-associated breast cancer occupies a special position in the choice of treatment strategy. Although, the drug treatment of such patients was almost the same as the treatment of sporadic disease. Of particular interest is the assessment of the deficit of homologous recombination, which may include various dysfunctions of the *BRCA1* gene. Moreover, it has been shown that a decrease in the functional activity of *BRCA1* is reflected in the sensitivity of the tumor to DNA damaging agents, and the prognosis of the disease becomes more favorable.

Aim: assessment of the association of *BRCA1* gene expression in a breast tumor with the prognosis of the disease.

Materials and methods. The study included 111 patients with breast cancer $T_{1-4}N_{0-3}M_0$ (stage IIA – IIIB), with a morphologically verified diagnosis. Initial and postoperative expression of *BRCA1* in tumor material was evaluated. RNA was isolated from the tumor material before treatment and after NAC. The level of *BRCA1* expression was assessed using reverse transcriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR).

Results. As a result of the study, long-term results of treatment of patients were evaluated depending on the level of *BRCA1* gene expression. The presence of *BRCA1* hypoexpression (level less than 1) in tumor tissue after NAC was found to be a favorable prognostic factor and is associated with high rates of metastasis-free survival ($p=0.0002$). In addition, a similar result is shown for patients treated with the FAC NAC regimen ($p=0.005$). An interesting result was demonstrated for 8 patients who underwent chemotherapy with the inclusion of platinum drugs. All patients had a low postoperative expression level of *BRCA1* and 100% non-metastatic and overall survival.

Conclusion. Thus, the data obtained indicate the prognostic significance of *BRCA1* gene expression in a breast tumor after neoadjuvant chemotherapy.

Keywords: breast cancer; *BRCA1*; expression; non-metastatic survival; forecast; lack of homologous recombination