

# Генетический портрет первичной лекарственной устойчивости различных морфологических структур рака молочной железы

Герашенко Т.С.<sup>1,2\*</sup>, Денисов Е.В.<sup>1,2</sup>, Завьялова М.В.<sup>1,2,3</sup>, Литвяков Н.В.<sup>1,2</sup>, Вторушин С.В.<sup>1,3</sup>, Паутова Д.Н.<sup>2</sup>, Крахмаль Н.В.<sup>3</sup>, Скрыбин Н.А.<sup>2,4</sup>, Слепцов А.А.<sup>2,4</sup>, Чердынцева Н.В.<sup>1,2</sup>, Перельмутер В.М.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> — Томский НИИ онкологии, Томский НИМЦ, Томск; \* t.gerashenko@list.ru

<sup>2</sup> — Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Томск

<sup>3</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск

<sup>4</sup> — НИИ медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск

Произведена оценка влияния внутриопухолевой морфологической гетерогенности рака молочной железы (РМЖ) на эффективность химиотерапии с учетом различных клинико-патологических параметров опухоли и поиск механизмов её вклада в химиорезистентность заболевания методами полнотранскриптомного и ПЦР анализа генной экспрессии. Показана значительная ассоциация между наличием в опухоли альвеолярных и трабекулярных структур и химиорезистентностью РМЖ, идентифицированы экспрессионные маркеры: *NAT1*, *ABCA12*, *ABCC1*, *ABCG1*, *PIK3C3*, *TXN2*, *SLC23A2*, *SLC25A13*, *SLC1A3*, *UBE2S*, обуславливающие дифференциальный вклад различных морфологических структур в лекарственную устойчивость.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, внутриопухолевая гетерогенность, химиотерапия

## Genetic portrait of intrinsic drug resistance of various morphological structures in breast cancer

Gerashchenko T.S.<sup>1,2\*</sup>, Denisov E.V.<sup>1,2</sup>, Zavyalova M.V.<sup>1,2,3</sup>, Litviakov N.V.<sup>1,2</sup>, Vtorushin S.V.<sup>1,3</sup>, Pautova D.N.<sup>2</sup>, Krakhmal N.V.<sup>3</sup>, Skryabin N.A.<sup>2,4</sup>, Sleptcov A.A.<sup>2,4</sup>, Cherdyntseva N.V.<sup>1,2</sup>, Perelmutter V.M.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> — Tomsk Cancer Research Institute, 634050, Tomsk, 5 Kooperativny Str.; \* t.gerashenko@list.ru

<sup>2</sup> — National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia

<sup>3</sup> — Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>4</sup> — Research Institute of Medical Genetics, Tomsk, Russia

We aimed to estimate the influence of intratumor morphological heterogeneity of breast cancer on the chemotherapy response depending on clinical-pathological parameters and to identify the molecular mechanisms of the association, obtained here, by whole transcriptome profiling and PCR analysis. We found the significant association between the presence of alveolar and trabecular structures in breast tumors and chemoresistance and identified expression markers: *NAT1*, *ABCA12*, *ABCC1*, *ABCG1*, *PIK3C3*, *TXN2*, *SLC23A2*, *SLC25A13*, *SLC1A3*, and *UBE2S* that may determine the differential contribution of morphological structures in breast cancer chemoresistance.

**Key words:** breast cancer, intratumoral heterogeneity, chemotherapy

### Актуальность

Как известно, внутриопухолевая гетерогенность в значительной степени определяет восприимчивость опухоли к лекарственному воздействию [1]. Для РМЖ характерно высокое морфологическое разнообразие опухолевого состава. В опухолях инвазивной карциномы (80% всех случаев РМЖ) описаны 5 различных типов инфильтративного компонента, или морфологических структур: альвеолярные, тубулярные, трабекулярные, солидные структуры и дискретные группы опухо-

левых клеток. Первые результаты говорят о связи внутриопухолевой морфологической гетерогенности и эффективности химиотерапии. Так, наличие в опухоли альвеолярных и трабекулярных структур, наряду с повышенным общим морфологическим разнообразием, связано с плохим ответом на неoadъювантную химиотерапию [2, 3]. Предыдущие исследования показали, что для трабекулярных структур характерна высокая экспрессия генов АВС-транспортеров (главным образом *ABCB1* и *ABCG2*), что, вероятно, обуславливает их вклад

в лекарственную устойчивость, однако механизмы ассоциации альвеолярных структур с химиорезистентностью неизвестны [3, 4]. Для получения полной картины вклада внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ в результативность химиотерапии необходимы дальнейшие исследования на более представительном материале с учетом клинико-патологических параметров опухоли. Кроме того, необходимо исследование функциональных особенностей различных морфологических структур, обуславливающих их дифференциальный вклад в эффективность лечения РМЖ.

**Цель.** Оценить влияние внутриопухолевой морфологической гетерогенности РМЖ на формирование лекарственной устойчивости и изучить возможные механизмы её вклада в химиорезистентность заболевания.

### Материал и методы

В ассоциативное исследование были включены 434 пациентки с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа  $T_{1-4}N_{0-3}M_0$  в возрасте от 28 до 90 лет (средний возраст  $49,8 \pm 9,51$  года), получавших 2—4 курса неoadъювантной химиотерапии (НАХТ). В формалин-фиксированных образцах опухолевой ткани ( $n = 434$ ) проводилась оценка наличия различных типов морфологических структур. В экспрессионное профилирование были включены 10 пациенток с инвазивной карциномой молочной железы неспецифического типа  $T_{1-2}N_{0-3}M_0$  в возрасте от 42 до 65 лет (средний возраст  $53,0 \pm 9,28$  года) люминального В молекулярного подтипа, не получавших НАХТ. Из замороженных образцов операционного материала ( $n = 10$ ) с помощью лазерной микродиссекции были получены различные морфологические структуры, из структур выделена мРНК и оценен показатель ее целостности (RIN). Амплифицированная мРНК (кДНК) использовалась для полнотранскриптомного микроматричного ( $n = 3$ ) и ПЦР ( $n = 7$ ) экспрессионного анализов. Полнотранскриптомное профилирование было проведено на микроматрицах SurePrint G3 v2 8x60, Agilent. Результаты обоих экспрессионных анализов стандартизировались относительно нормальных протоков молочной железы. Подсчет уровня экспрессии (ПЦР анализ) велся относительно референсного гена *ACTB*. Подсчет статистической значимости уровня экспрессии генов относительно контроля проводился с использованием t-критерия Стьюдента (moderated t-statistic) и поправки на множественные сравнения Бенджамини—Хохберга, используя пакет программ R и расширение LIMMA. Подсчет статистической значимости ассоциации между наличием в опухоли различных морфологических структур и эффективностью химиотерапии проводился с помощью критерия  $\chi^2$ . Корреляция результатов ПЦР и микроматричного анализа подсчитывалась с помощью регрессионного анализа ( $r^2 = 0,71$ ,  $p < 0,05$ ). Статистическая обработка осуществлялась с помощью пакета программ «Statistica 8.0».

### Результаты

Лекарственная устойчивость чаще наблюдалась в опухолях с большим морфологическим разнообразием (3—5 структур по сравнению с 1—2 структурами,  $p = 0,0082$ ). Пациенты с наличием альвеолярных или трабекулярных структур в опухолях молочной железы чаще демонстрировали плохой ответ на НАХТ по сравнению с опухолями без данных структур (50,3% против 35,8%,  $p = 0,0056$ ; 50,7% против 31,6%,  $p = 0,0004$  соответственно). Интересно, что связь альвеолярных структур с химиорезистентностью наблюдалась только в группе пациенток с лимфогенными метастазами: 57,1% (больные с наличием структур) против 36,2% (больные без структур;  $p = 0,0089$  соответственно). В то же время связь трабекулярных структур с химиорезистентностью была обнаружена только у пациенток без лимфогенных метастазов (45,8% против 28,0%,  $p = 0,0117$  соответственно). Связь структур с эффективностью НАХТ находилась в зависимости от менопаузы больных РМЖ. Наличие альвеолярных, либо трабекулярных структур, либо дискретных групп клеток было связано с плохим ответом на химиотерапию только в подгруппе больных, находящихся в состоянии пременопаузы (51,0% против 33,3%,  $p = 0,0133$ ; 56,2% против 24,7%,  $p = 0,0000$ ; 50,0% против 35,0%,  $p = 0,0365$  соответственно). Отсутствие солидных структур оказалось связанным с плохим ответом на химиотерапию только у пременопаузальных пациенток (51,6% против 33,0%,  $p = 0,0094$ ).

Проведенный микроматричный экспрессионный анализ показал, что различные морфологические структуры опухолей молочной железы по сравнению с клетками нормального эпителия молочной железы демонстрируют экспрессию как общих, так и специфических генов. Анализ экспрессии генов, ассоциированных с химиорезистентностью, показал, что наибольшее количество генов ABC-транспортеров, осуществляющих активный выброс химиопрепаратов из клетки, было характерно для альвеолярных структур и дискретных групп опухолевых клеток. Однако, только в альвеолярных структурах наблюдалась экспрессия наиболее значимых в плане лекарственной устойчивости генов *ABCC1*, осуществляющего выброс эпозида, доксорубина, циклофосамида и других препаратов [5], и *ABCG1*, вызывающего резистентность к адриамицину [6]. Более того, функциональное аннотирование с помощью программы IPA (Qiagen, США) показало, что пути, связанные с лекарственной устойчивостью ассоциированы только с альвеолярными структурами. На основании результатов микроматричного экспрессионного анализа и литературных данных, с учетом предыдущих данных об ассоциации альвеолярных и трабекулярных структур с химиорезистентностью, была сформирована панель из 10 генов, экспрессия которых в различных морфологических структурах может быть связана с чувствительностью или устойчивостью к химиотерапевти-

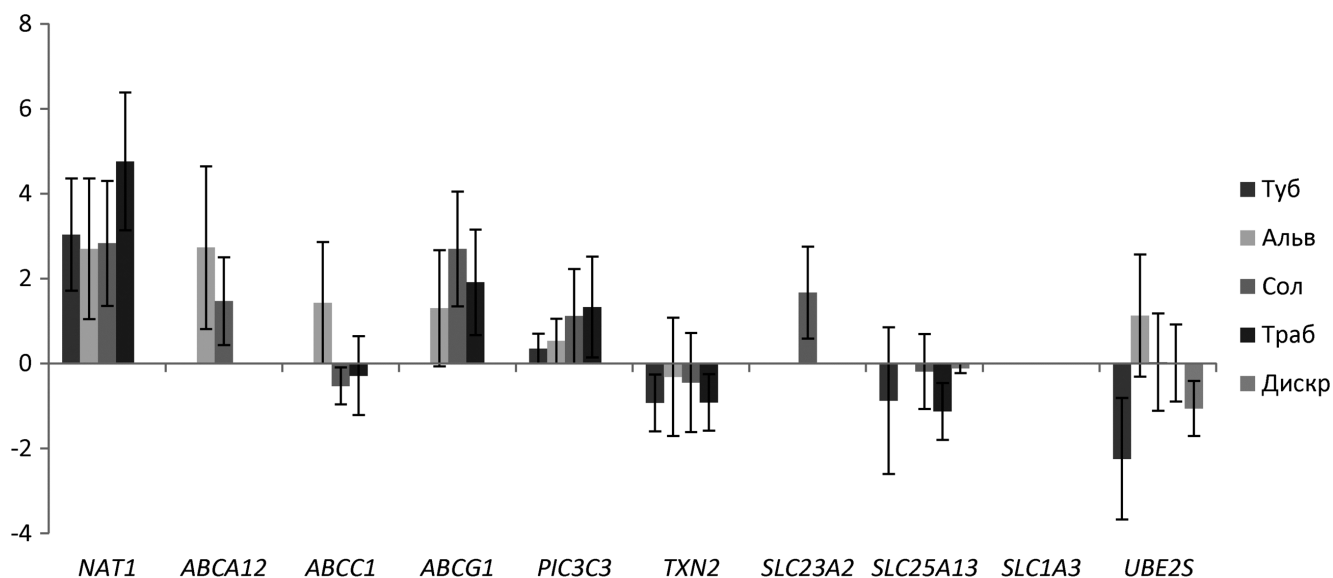


Диаграмма усредненных значений ( $\pm$  стандартная ошибка) уровня экспрессии генов, ассоциированных с лекарственной устойчивостью по результатам ПЦР анализа. Туб — тубулярные, Альв — альвеолярные, Сол — солидные, Траб — трабекулярные структуры, Дискр — дискретные группы опухолевых клеток.

ческим препаратам. В панель вошли гены, участвующие в различных механизмах лекарственной устойчивости, таких как транспорт препаратов в клетку, их метаболизм, выброс препаратов из клеток, регуляция митоза и пролиферации: *NAT1*, *ABCA12*, *ABCC1*, *ABCG1*, *PIK3C3*, *TXN2*, *SLC23A2*, *SLC25A13*, *SLC1A3*, *UBE2S*.

ПЦР анализ экспрессии показал, что для каждой из структур характерен специфический набор экспрессионных маркеров (рисунок).

Альвеолярные, солидные и трабекулярные структуры в разной степени характеризовались высокой экспрессией генов ABC-транспортёров и низкой экспрессией или отсутствием экспрессии генов SLC-транспортёров (за исключением экспрессии гена *SLC23A2* в солидных структурах), связанных, по данным литературы, с активным выбросом и низким поступлением лекарственных препаратов соответственно [7]. Стоит отметить, что экспрессия гена *NAT1*, продукт которого является ключевым в метаболизме ксенобиотиков [8], в наибольшей степени была характерна для трабекулярных структур, гиперэкспрессия гена *ABCC1*, связанного с активным выбросом доцетаксела, доксорубина и циклофосфана [5], была характерна только для альвеолярных структур. Гиперэкспрессия гена тиоредоксина 2 (*TXN2*), вовлеченного в супрессию апоптоза [9], в целом оказалась сниженной во всех структурах. Экспрессия гена-регулятора клеточных процессов, также ответственного за аутофагию в условиях злокачественного роста *PIK3C3* [10] в наибольшей степени встречалась в трабекулярных, солидных и альвеолярных структурах. Гиперэкспрессия гена *UBE2S*, регулятора лекарственно индуцированного митотического

ареста, связанного с резистентностью к таксанам [11], была характерна только для альвеолярных структур. В целом, полученные данные характеризуют альвеолярные, солидные и трабекулярные структуры как структуры с химиорезистентным фенотипом. Дискретные группы опухолевых клеток обладают выраженным химиочувствительным фенотипом.

## Выводы

Была показана ассоциация наличия в опухоли альвеолярных и трабекулярных структур с эффективностью химиотерапии, находящаяся в зависимости от лимфогенного метастазирования и менопаузального статуса больных. Механизм вклада альвеолярных структур в химиорезистентность преимущественно связан с активным выбросом лекарственных средств (*ABCA12*, *ABCC1*, *ABCG1*), детоксикацией ксенобиотиков (*NAT1*) и регуляцией митотического ареста (*UBE2S*), в то время как трабекулярных структур — с низким поступлением лекарственных средств (*SLC25A13*), активной аутофагией (*PIK3C3*) и высоким метаболизмом ксенобиотиков (*NAT1*).

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Исследование выполнено при поддержке Геращенко Т.С. программой «УМНИК» фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере, договор №3948 ГУ1/2014*

**Список литературы**

1. Marusyk A, Almendro V and Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer. *Annu Rev Pathol.* 2013;(8):277-302.
2. Завьялова МВ, Литвяков НВ, Гарбуков ЕЮ, Вторушин СВ и др. Взаимосвязь чувствительности опухоли к неoadъювантной химиотерапии с морфологическим строением первичного опухолевого узла при уницентрическом инфильтрирующем протоковом раке молочной железы. *Сибирский онкологический журнал.* 2008;(6):30-34.
3. Denisov EV, Litviakov NV, Zavyalova MV, Perelmuter VM et al. Intratumoral morphological heterogeneity of breast cancer: neoadjuvant chemotherapy efficiency and multidrug resistant gene expression. *Sci Rep.* 2014; 4:4709.
4. Denisov EV, Gerashchenko TS, Zavyalova MV, Litviakov NV et al. Invasive and drug resistant expression profile of different morphological structures of breast tumors. *Neoplasma.* 2015; 62(3); 405-411.
5. Munoz M, Henderson M, Haber M and Norris M. Role of the MRP1/ABCC1 Multidrug Transporter Protein in Cancer. *Life.* 2007;59(12):752 — 757
6. Zhang J-T. Use of arrays to investigate the contribution of ATP-binding cassette transporters to drug resistance in cancer chemotherapy and prediction of chemosensitivity. *Cell Research.* 2007;17:311-323
7. Januchowski R, Zawierucha P, Rucinski M, Andrzejewska M. et al. Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2014;68(4):447-453
8. Rodrigues-Lima F, Dairou J, Busi F and Dupret J-M. Human Arylamine *N*-acetyltransferase 1: From Drug Metabolism to Drug Target. *Cell Signaling & Molecular Targets in Cancer.* ed. Malay Chatterjee, Khosrow Kashfi. Springer. 2011; 23-35.
9. Kim S.J., Miyoshi Y., Taguchi T. et al. High Thioredoxin Expression Is Associated with Resistance to Docetaxel in Primary Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11(23):8425-8430
10. Stephens L, Williams R and Hawkins P. Phosphoinositide 3-kinases as drug targets in cancer. *Current Opinion in Pharmacology.* 2005;5:357-365
11. Garnett M J, Mansfield J, Godwin C, Matsusaka T. et al. UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit. *Nature cell biology.* 2009;11:1363-1370