

DOI: 10.21294/18144861-2017-16-2-27-35

УДК: 618.19-006.6-08:577.112:577.21:577.169

Для цитирования: *Бабышкина Н.Н., Вторушин С.В., Дронова Т.А., Крахмаль Н.В., Завьялова М.В., Цыганов М.М., Паталяк С.В., Слонимская Е.М., Чердынцева Н.В.* Роль рецептора трансформирующего фактора роста $\beta 1$ типа (TGF- β RI) в прогрессировании люминального подтипа рака молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2017; 16 (2): 27–35. - DOI: 10.21294/18144861-2017-16-2-27-35

For citation: *Babyshkina N.N., Vtorushin S.V., Dronova T.A., Krakhmal N.V., Zavyalova M.V., Tsyganov M.M., Patalyak S.V., Slonimskaya E.M., Cherdynitseva N.V.* Role of transforming growth factor receptor $\beta 1$ type (TGF- β RI) in the progression of the luminal breast cancer subtype. Siberian Journal of Oncology. 2017; 16 (2): 27–35. - DOI: 10.21294/18144861-2017-16-2-27-35

РОЛЬ РЕЦЕПТОРА ТРАНСФОРМИРУЮЩЕГО ФАКТОРА РОСТА $\beta 1$ ТИПА (TGF- β RI) В ПРОГРЕССИРОВАНИИ ЛЮМИНАЛЬНОГО ПОДТИПА РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.Н. Бабышкина^{1,2}, С.В. Вторушин^{1,3}, Т.А. Дронова², Н.В. Крахмаль^{1,3},
М.В. Завьялова^{1,2,3}, М.М. Цыганов^{1,2}, С.В. Паталяк¹, Е.М. Слонимская^{1,3},
Н.В. Чердынцева^{1,2}

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия¹

634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: nbabyshkina@mail.ru¹

ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г. Томск, Россия²
634050, г. Томск, пр. Ленина, 36²

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Томск, Россия³
634050, г. Томск, Московский тракт, 2³

Аннотация

Введение. Перекрестные связи между сигнальными путями эстрогеновых рецепторов и рецепторов факторов роста могут играть важную роль в возможном снижении устойчивости опухолей молочной железы к эндокринной терапии. **Целью исследования** явилось изучение взаимосвязи белковой и генной экспрессии рецептора трансформирующего фактора роста $\beta 1$ типа (TGF- β RI) и его полиморфных вариантов с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном при люминальном раке молочной железы (РМЖ). **Материал и методы.** В исследование включено 105 пациенток с люминальным подтипом РМЖ ($T_{1-3}N_{0-3}M_0$), получавших тамоксифен в адъювантном режиме в стандартной дозировке 20 мг/сут. При оценке отдаленных результатов лечения пациентки, имевшие прогрессирование заболевания на фоне приема тамоксифена, составили тамоксифен-резистентную группу (ТАМ-Р), больные без признаков прогрессирования – тамоксифен-чувствительную группу (ТАМ-Ч). Уровень экспрессии гена *TGF- β RI* и полиморфизм *TGF- β RI* (rs334354) были изучены с помощью ПЦР в режиме реального времени. Белковая экспрессия TGF- β RI в опухоли была оценена иммуногистохимическим методом. **Результаты.** Выявлен высокий уровень экспрессии мРНК *TGF- β RI* в опухоли у больных люминальным А подтипом по сравнению с люминальным В РМЖ ($p=0,050$). Показано, что носители мутантных генотипов и аллелей гена *TGF- β RI* (rs334354) чаще встречались у пациенток с люминальным А раком молочной железы ($p=0,019$ и $p=0,007$ соответственно). Уровень экспрессии белка TGF- β RI был значимо выше в тамоксифен-чувствительной группе по сравнению с тамоксифен-резистентными пациентками без учета подтипа опухоли ($p=0,043$). При разделении больных по молекулярному подтипу выявлена тенденция к взаимосвязи высокого уровня белковой экспрессии TGF- β RI с чувствительностью к терапии тамоксифеном среди больных люминальным В раком молочной железы ($p=0,090$). **Заключение.** Уровень экспрессии TGF- β RI в опухолевой ткани может рассматриваться в качестве потенциального молекулярно-генетического маркера эффективности эндокринной терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы.

Ключевые слова: люминальный рак молочной железы, эндокринная терапия, тамоксифен, рецептор трансформирующего фактора роста $\beta 1$ типа (TGF- β RI), полиморфизм генов.

Люминальный рак молочной железы (PMЖ) является наиболее часто встречающимся молекулярным подтипом, который характеризуется наличием позитивной экспрессии рецепторов к стероидным гормонам и высокими показателями чувствительности к эндокринной терапии [1, 2]. Люминальный PMЖ представляет собой гетерогенную группу опухолей: люминальный А подтип является положительным по экспрессии к эстроген/прогестерону (ERa/PR), без гиперэкспрессии рецептора эпидермального фактора роста 2-го типа (HER2), с низким индексом пролиферативной активности Ki67; люминальный В тип может быть представлен подтипами, положительными по экспрессии к ERa/PR, без гиперэкспрессии HER2, с высоким индексом Ki67, а также опухолями, позитивными по экспрессии рецепторов как к стероидным гормонам, так и к HER2. Несмотря на то, что эндокринотерапия является наиболее эффективным и низкотоксичным методом лечения больных люминальным PMЖ, преодоление развития резистентности к данной терапии остается одной из актуальных проблем.

В качестве возможных механизмов формирования резистентности к эндокринной терапии в настоящее время рассматривается двунаправленное взаимодействие между эстрогеновыми рецепторами и сигнальными путями трансформирующего фактора роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), который играет важную роль в процессах клеточной пролиферации и дифференцировки большинства эпителиальных опухолей [3]. В TGF- $\beta 1$ /Smad-сигнальную трансдукцию вовлечены два типа мембранных рецепторов – TGF- $\beta R I$ и TGF- $\beta R II$. Классический сигнальный каскад включает связывание TGF- $\beta 1$ с внеклеточным доменом рецептора II типа, что приводит к последующей активации рецептора I типа и фосфорилированию белков Smad2 и Smad3. Smad2/3 комплексируются с Smad4 и образуют гетеромерный комплекс Smad2/3/4, который транлоцируется внутрь клеточного ядра, где может связываться с активирующими белками и функционировать как транскрипционный активатор, индуцирующий экспрессию генов-мишеней, вовлеченных в регуляцию процессов клеточного цикла [4]. Клинико-экспериментальные исследования свидетельствуют о том, что ядерные эстрогеновые рецепторы блокируют TGF- $\beta 1$ сигнальный путь посредством деградации его основных компонентов Smad2/3 и активации MAPK [5, 6]. В свою очередь, Smad3 и Smad4 способны выступать в роли коактиваторов и корепрессоров соответственно ERa-индуцированной экспрессии генов-мишеней, ответственных за регуляцию пролиферации [7, 8].

Среди мембранных рецепторов TGF- $\beta 1$ наиболее полно представлены результаты исследования в плане прогностической значимости лишь для TGF- $\beta R II$, однако они далеко не однозначны. Показано, что высокий уровень экспрессии TGF-

$\beta R II$ ассоциирован с наличием метастазов в регионарные лимфоузлы и низкими показателями пятилетней безметастатической выживаемости у больных PMЖ независимо от молекулярного подтипа [9]. Согласно другим данным, отсутствие экспрессии TGF- $\beta R II$ в опухолевой ткани связано с гематогенным метастазированием у больных HER2 позитивным PMЖ [10]. Единичные исследования посвящены изучению TGF- $\beta R II$ как маркера чувствительности к адъювантной гормональной терапии. В недавних работах было продемонстрировано, что потеря экспрессии TGF- $\beta R II$ является одним из механизмов неэффективности эндокринной терапии у больных PMЖ [11]. Следует отметить, что в литературных источниках не изучена роль TGF- $\beta R I$ в сопоставлении с эффективностью терапии тамоксифеном у больных PMЖ. Однако TGF- $\beta R I$ является не менее важным звеном TGF- $\beta 1$ /Smad сигнального пути. Наличие в структуре рецептора консервативного 30 аминокислотного региона, так называемого SG-субдомена, содержащего SGS GSG последовательность, фосфорилирование которого определяет передачу внутриклеточного сигнала, является уникальной особенностью TGF- $\beta R I$ [12].

TGF- $\beta R I$ представляет собой трансмембранный серин/треонинкиназный рецептор с молекулярной массой 55 кД, который содержит сигнальный пептид, богатый цистеином N-гликозилированный внеклеточный домен, цитоплазматический киназный домен и короткий C-концевой хвост. В настоящее время выделено множество полиморфных форм гена TGF- $\beta R I$, один из которых – однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в 7 интроне Int7G24A (rs334354) – представляет собой замену гуанина (G) на аденин (A) в 24 позиции донорного сайта. Функциональная роль данного интронного варианта остается не до конца понятной, хотя предполагается, что подобные мутационные замены нуклеотидов могут опосредованно влиять на экспрессию гена на уровне транскрипции либо изменять сплайсинг РНК [13]. В настоящее время имеются единичные данные о взаимосвязи Int7G24A SNP с клиническим течением рака молочной железы [13]. Следует отметить, что прогностическая значимость данной интронной мутации во взаимосвязи с уровнем экспрессии как гена, так и белка TGF- $\beta R I$ у больных люминальным PMЖ остается в настоящее время неизученной.

Целью исследования явилось изучение взаимосвязи белковой и генной экспрессии рецептора трансформирующего фактора роста $\beta 1$ типа и его полиморфных вариантов с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном при люминальном раке молочной железы.

Материал и методы

В исследование были включены 105 пациенток с операбельным раком молочной железы T₁₋₄N₀₋₃M₀

стадии, получавших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2002 по 2014 г. У всех больных диагноз был подтвержден морфологически. Всем пациенткам было выполнено радикальное хирургическое лечение, лучевая и химиотерапия – по показаниям. Обязательным условием для включения больных в исследование было проведение адъювантной эндокринотерапии (тамоксифен в стандартной дозировке 20 мг/сут). Неоадъювантное лечение не проводилось. Для определения подтипа люминального рака молочной железы была использована классическая панель из иммуногистохимических маркеров ERα, PR, HER2 и Ki67. К люминальному А подтипу РМЖ относили опухоли с негативной экспрессией HER2, позитивной экспрессией рецепторов к эстрогенам и прогестерону и пролиферативной активностью менее 20 %. К люминальному В подтипу – гормон-положительные опухоли как с позитивной, так и с негативной экспрессией HER2 и высоким уровнем пролиферативной активности (Ki67 ≥ 20 %).

Из 105 пациенток, включенных в исследование, 65 (61,9 %) имели люминальный А подтип рака молочной железы, 40 (38,1 %) – люминальный В подтип (табл. 1). Возраст больных варьировался от 30 до 79 лет, в среднем – 54,5 ± 0,9 года. Доля молодых женщин (до 50 лет включительно) в обеих группах составила 43,1 % и 40,0 % соответственно, соотношение женщин старше 50 лет также статистически не различалось в зависимости от подтипа опухоли (p=0,915). В зависимости от размера первичной опухоли наблюдалась тенденция к увеличению

размера опухолевого узла у больных люминальным В РМЖ (p=0,053). Не было найдено ассоциаций между исследуемыми группами и менструальным статусом пациенток (p=0,220), лимфогенным метастазированием (p=0,477), гистологическим типом опухоли (p=0,898) и адъювантной химиотерапией (p=0,826). Таким образом, сравниваемые группы пациенток с люминальным раком молочной железы были сопоставимы по основным клинико-морфологическим параметрам.

Отдаленные результаты лечения оценивались по факту прогрессирования заболевания в виде отдаленных метастазов, на основании которых были сформированы две группы больных. Первую группу составили пациентки без признаков прогрессирования (тамоксифен-чувствительная группа – ТАМ-Ч, n=53), вторую – с прогрессированием заболевания (тамоксифен-резистентная подгруппа – ТАМ-Р, n=39). Все случаи прогрессирования наблюдались на фоне адъювантной терапии тамоксифеном. Среднее время до прогрессирования – 28,6 ± 17,8 мес.

Материалом для исследования служили образцы опухолевой и прилежащей нормальной ткани. Для изучения уровня экспрессии гена *TGF-βRI* из опухолевой и прилежащей нормальной ткани с помощью набора RNeasy Plus mini Kit, содержащего ДНК-азу I (Qiagen, Германия), была выделена тотальная РНК. Для получения кДНК на матрице РНК проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора RevertAid™ (Fermentas, Литва). Уровень экспрессии гена *TGF-βRI* оценивали при помощи количественной ПЦР в режиме реального

Таблица 1

Клинико-морфологическая характеристика больных РМЖ в зависимости от молекулярного подтипа опухоли

Параметры	Люминальный А (n=65)	Люминальный В (n=40)	p
Возраст			
≤50 лет	28 (43,1 %)	16 (40,0 %)	0,915
>50 лет	37 (56,9 %)	24 (60,0 %)	
Состояние менструальной функции			
Сохранена	31 (47,7 %)	24 (60,0 %)	0,220
Менопауза	34 (52,3 %)	16 (40,0 %)	
Размер опухоли			
T ₁	30 (46,2 %)	16 (40,0 %)	0,053
T ₂	35 (53,8 %)	21 (52,5 %)	
T ₃₋₄	0 (0,0 %)	3 (7,5 %)	
Лимфогенное метастазирование			
N ₀	45 (69,2 %)	25 (62,5 %)	0,477
N ₁₋₃	20 (30,8 %)	15 (37,5 %)	
Гистологический тип			
Протоковый	51 (78,5 %)	31 (77,5 %)	0,898
Дольковый	10 (15,3 %)	5 (12,5 %)	
Другие	4 (6,2 %)	4 (10,0 %)	
Адъювантная химиотерапия			
Да	42 (64,6 %)	25 (62,5 %)	0,826
Нет	23 (35,4 %)	15 (37,5 %)	

времени (qPCR) на амплификаторе CFX96 («Bio–Rad», США). Праймеры и зонды (FAM–BHQ1) были подобраны с использованием программы Vector NTI Advance 11,5 и базы данных NCBI. ПЦР ставили 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. Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг кДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94°C, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1-й шаг 94°C, 10 сек и 2-й шаг 20 сек, – при температуре 60°C. Уровень экспрессии *TGF-βRI* нормализовали по отношению к экспрессии гена *GAPDH* (glyceraldehydes–3–phosphate dehydrogenase). Уровень экспрессии гена *TGF-βRI* был оценен в относительных единицах с помощью метода 2^{-ΔΔCT} (Livak).

Для оценки полиморфных вариантов гена *TGF-βRI* проводилось выделение ДНК из образцов опухолевой ткани с помощью наборов Qiaamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Германия). Качественная и количественная оценка ДНК проведена на спектрофотометре NanoDrop–1000 («NanoDrop», США). Изучение полиморфных вариантов *TGF-βRI* Int7G24A (rs334354) выполнено с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Последовательность праймеров и проб подбирали при помощи программы OligoAnalysisVector NTI с использованием генетического банка данных (www.ncbi.nlm.nih.gov). Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл включала 100 нг геномной ДНК; 0,5–1,5 мкл специфической пары праймеров и проб с концентрацией 1 о.е./мл; 200 мкМ каждого дезоксинуклеотидтрифосфата; 1,2–2,0 мкл буфера (60 мМ Tris–HCl (pH 8,5 при 25°C), 1,5 мМ MgCl₂; 25 мМ KCl; 10 мМ 2-меркаптоэтанол; 0,1 % Тритон X-100) и 0,5–1,0 ед. Taq ДНК-полимеразы («Медиген», Новосибирск). Программа амплификации предполагала предварительную денатурацию при 95°C в течение 2 мин, с последующими 40 циклами денатурации

при 95°C (10 сек), отжиг при 60°C (30 сек) на амплификаторе CFX96 («Bio–Rad», США).

Изучение экспрессии рецепторов к половым гормонам, HER2, Ki67 и TGF–βRI проводили на парафиновых срезах иммуногистохимическим способом. Использовались антитела фирмы «Dako» к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, RTU, мышинные), прогестерона (клон PgR 636, RTU, мышинные), к онкопротеину c-erbB-2 (HER2) (рабочее разведение 1:500, кроличьи), к Ki67 (клон MIB-1, RTU, мышинные «Novocastra») и к TGF–βRI (клон 8A11, рабочее разведение 1:50, «Novocastra»).

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.93, № 2288) на основании разрешения локального комитета по биомедицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 7.0. Применялся критерий χ², обсуждались результаты с достоверностью различий при p<0,05.

Результаты

Выявлено, что у больных люминальным А подтипом уровень экспрессии гена *TGF-βRI* значимо выше (7,07 ± 2,99) по сравнению с люминальным В РМЖ (1,81 ± 0,55; p=0,050; рис. 1). При сравнении особенностей белковой экспрессии TGF–βRI в опухолевой ткани больных люминальным А и В подтипами статистически значимых различий обнаружено не было (табл. 2). Оценка полиморфных вариантов гена *TGF-βRI* показала значимое увеличение частоты встречаемости мутантного *Int7G24AA* генотипа и *Int7G24A* аллеля среди больных с люминальными А опухолями по отношению к люминальным В подтипам (p=0,019 и p=0,007 соответственно).

Изучение взаимосвязи исследуемых маркеров с эффективностью адъювантной терапии тамоксифеном было проведено как в общей группе больных РМЖ, так и в группах пациенток с люминальным

Таблица 2

Экспрессия белка TGF–βRI и полиморфизм гена *TGF-βRI* у больных РМЖ

Параметры	Число больных	Люминальный А	Люминальный В	p
TGF-βRI экспрессия				
Негативная	40	25 (45,5 %)	15 (39,5 %)	
Позитивная	53	30 (54,5 %)	23 (60,5 %)	0,566
<i>TGF-βRI</i> (rs334354)				
GG	64	32 (59,3 %)	32 (84,2 %)	
GA	21	16 (29,6 %)	5 (13,2 %)	0,019*
AA	7	6 (11,1 %)	1 (2,6 %)	
G allele		80 (74,1 %)	69 (90,8 %)	
A allele		28 (25,9 %)	7 (9,2 %)	0,007*

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями у больных люминальным А и люминальным В раком молочной железы.

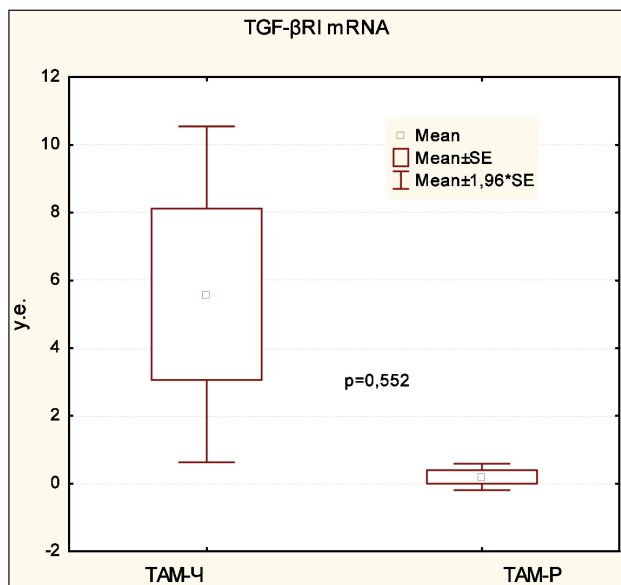
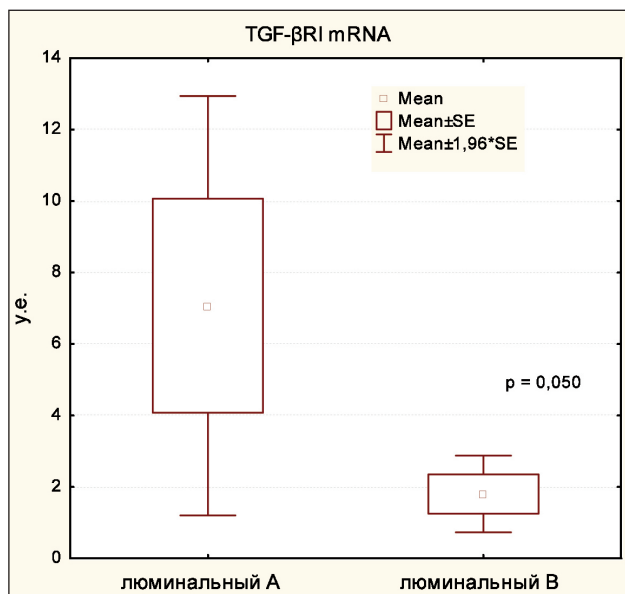


Рис. 1. Экспрессия гена *TGF-βRI* в образцах опухолевой ткани у больных люминальным А и люминальным В подтипами рака молочной железы. Моноплексная ПЦР, в качестве стандартного гена использован ген *GAPDH*. Каждая реакция проводилась трижды, приведены средние значения ± SE

Рис. 2. Экспрессия гена *TGF-βRI* в образцах опухолевой ткани у больных общей группы в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном. Моноплексная ПЦР, в качестве стандартного гена использован ген *GAPDH*. Каждая реакция проводилась трижды, приведены средние значения ± SE

Таблица 3

Экспрессия белка TGF-βRI и полиморфизм гена *TGF-βRI* в общей группе больных в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Параметры	Число больных	TAM-Ч	TMA-P	p
TGF-βRI экспрессия				
Негативная	35	21 (40,4 %)	14 (66,7 %)	0,043*
Позитивная	38	31 (59,6 %)	7 (33,3 %)	
<i>TGF-βRI</i> (rs334354)				
GG	48	33 (64,7 %)	15 (71,4 %)	0,664
GA	18	13 (25,5 %)	5 (23,8 %)	
AA	6	5 (9,8 %)	1 (4,8 %)	
G allele		79 (77,5 %)	35 (83,4 %)	0,572
A allele		23 (22,5 %)	7 (16,6 %)	

Примечание: * – статистически значимые различия между показателями в TAM-Ч и TAM-P группах.

Таблица 4

Экспрессия белка TGF-βRI и полиморфизм гена *TGF-βRI* у больных люминальным А и В подтипами РМЖ в зависимости от эффективности лечения тамоксифеном

Параметры	Люминальный А		p	Люминальный В		p
	TAM-Ч	TMA-P		TAM-Ч	TMA-P	
TGF-βRI экспрессия						
Негативная	12 (37,5 %)	9 (60,0 %)	0,148	9 (45,0 %)	5 (83,3 %)	0,090
Позитивная	20 (62,5 %)	6 (40,0 %)		11 (55,0 %)	1 (16,7 %)	
<i>TGF-βRI</i> (rs334354)						
GG	17 (54,8 %)	10 (66,7 %)	0,445	16 (80,0 %)	5 (83,3 %)	0,885
GA	10 (32,3 %)	4 (26,6 %)		3 (15,0 %)	1 (16,7 %)	
AA	4 (12,9 %)	1 (6,7 %)		1 (5,0 %)	0 (0,0 %)	
G allele	44 (70,9 %)	24 (80,0 %)	0,502	35 (87,5 %)	11 (91,7 %)	0,576
A allele	18 (29,1 %)	6 (20,0 %)		5 (12,5 %)	1 (8,3 %)	

А и В подтипом опухоли. Анализ уровня экспрессии мРНК гена *TGF-βRI* не выявил статистически значимых различий в общей группе больных РМЖ без учета подтипа опухоли ($p=0,552$; рис. 2). Дальнейшая стратификация пациенток в зависимости от молекулярного подтипа подтвердила найденные закономерности. Тамоксифен-чувствительные пациентки как с люминальным А, так и с люминальным В РМЖ, имели более высокий уровень генной экспрессии *TGF-βRI* по сравнению с тамоксифен-резистентной группой соответственно люминального А и В РМЖ ($p=0,637$ и $p=0,542$ соответственно). Следует отметить, что в отличие от экспрессии гена, уровень белковой экспрессии *TGF-βRI* был связан с эффективностью гормональной терапии тамоксифеном в общей группе больных. *TGF-βRI*-позитивно окрашенные клетки выявлены в 59,6 % наблюдений у пациенток без прогрессирования по сравнению с 33,3 % больных тамоксифен-резистентной группы ($p=0,043$, табл. 3). При разделении группы больных по молекулярному подтипу выявлена тенденция к взаимосвязи высокого уровня экспрессии белка *TGF-βRI* с чувствительностью к терапии тамоксифеном только среди больных люминальным В раком молочной железы ($p=0,090$, табл. 4). При изучении распределения генотипов и аллелей гена *TGF-βRI* как в общей группе пациенток, так и в зависимости от подтипа опухоли значимых ассоциаций с эффективностью проводимой терапии не обнаружено.

Обсуждение

Литературные данные об экспрессии гена *TGF-βRI* и его белкового продукта при раке молочной железы немногочисленны, в основном они проводятся в общих группах больных без учета молекулярного подтипа опухоли, касаются или количественного распределения содержания мРНК, либо полуквантитативной оценки белка в опухоли и не сопоставляются между собой. В единичных исследованиях определена прогностическая роль экспрессии мРНК гена *TGF-βRI*, высокие уровни которого связаны с неблагоприятным исходом для больных раком молочной железы, особенно при малых опухолях [14]. Подобные закономерности были выявлены при изучении белковой экспрессии *TGF-βRI*: низкие показатели безметастатической выживаемости больных РМЖ связаны с высоким уровнем экспрессии белка *TGF-βRI* [15]. Существует ряд работ, посвященных изучению полиморфизма гена *TGF-βRI* (rs334354), однако представлены результаты исследования только его рисковой значимости, которые получены для общей выборки больных РМЖ без сопоставления с молекулярными подтипами. Так, в работе Song et al. не выявлено ассоциаций между мутантным аллелем *Int7G24A* и риском развития РМЖ [16]. Более ранние опубликованные данные указывают на взаимосвязь носительства данного полиморф-

ного варианта с инвазивным и метастатическим РМЖ [13].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что прогностически благоприятный люминальный А подтип РМЖ характеризуется более высоким уровнем экспрессии мРНК *TGF-βRI* и высокой частотой встречаемости мутантных генотипов и аллелей гена *TGF-βRI* (rs334354) по сравнению с люминальным В РМЖ. Можно полагать, что подобные нуклеотидные замены в интроне приводят к возникновению функционально активного варианта гена *TGF-βRI*. Кроме того, известно, что антипролиферативные эффекты *TGF-β1* на ранних стадиях РМЖ могут поддерживаться за счет высокой активности не только лиганда, но и его рецепторов, что способствует, в конечном итоге, более благоприятному клиническому течению заболевания.

Наиболее значимым полученным результатом является прогностическая ценность уровня белковой экспрессии *TGF-βRI* в опухолевой ткани у больных люминальным подтипом РМЖ. Проведенное исследование указывает на то, что низкий уровень экспрессии белка *TGF-βRI* является одним из факторов, связанных с неэффективностью лечения тамоксифеном, в большей степени, по-видимому, для пациенток с люминальным В подтипом РМЖ. Можно предположить, что низкая функциональная активность *TGF-βRI* может обуславливать неполноценную функциональную реализацию *TGF-β1/Smad* сигнальной трансдукции, приводящую к активации пролиферативных процессов в опухоли, в том числе и посредством запуска альтернативных сигнальных каскадов. Вероятно, ключевую роль при этом имеет функциональный статус эстрогеновых рецепторов (активация ERα, наличие мутаций и точечных замен), которые могут быть вовлечены в супрессию *TGF-β1/Smad* пути. Следует подчеркнуть, что пока не изучен вклад *TGF-βRI* в реализацию механизмов опухолевой прогрессии у больных, получавших терапию тамоксифеном. Вероятно, экспрессия *TGF-βRI* в опухоли может рассматриваться в качестве маркера резистентности к терапии тамоксифеном, как и *TGF-βRII*, низкий уровень экспрессии которого является независимым предиктором ответа на тамоксифен у пременопаузальных больных [11]. Однако полученные данные требуют дополнительного подтверждения.

Заключение

Проведенное исследование указывает на то, что уровень белковой экспрессии *TGF-βRI* может рассматриваться в качестве потенциального молекулярно-генетического маркера эффективности эндокринной терапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президента РФ, грант № МД-9084.2016.7 (молекулярно-генетические исследования), и РФФИ, грант № 16-54-76015 ЭРА_а (набор биологических образцов и клинические данные пациентов).

ЛИТЕРАТУРА

1. Стенина М.Б., Фролова М.А. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет. Практическая онкология. 2011; 12 (1): 6–11.
2. Семизлазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семизлазов В.В., Дамян Г.А., Семизлазова Т.Ю., Криворотько П.В., Николаев К.С. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St. Gallen-2015, адаптированные экспертами Российского общества онкомаммологов. Опухоли женской репродуктивной системы. 2015; 3: 43–60. doi: <http://dx.doi.org/10.17650/1994-4098-2015-11-3-43-60>.
3. Band A.M., Laiho M. Crosstalk of TGF- β and estrogen receptor signaling in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2011; 16 (2): 109–15. doi: [10.1007/s10911-011-9203-7](http://dx.doi.org/10.1007/s10911-011-9203-7).
4. Derynck R., Zhang Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. Nature. 2003 Oct 9; 425 (6958): 577–84.
5. Kleuser B., Malek D., Gust R., Pertz H.H., Potteck H., Kleuser B., Malek D., Gust R., Pertz H.H., Potteck H. 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. Mol Pharmacol. 2008 Dec; 74: 1533–43. doi: [10.1124/mol.108.046854](http://dx.doi.org/10.1124/mol.108.046854).
6. Ito I., Hanyu A., Wiyama M., Goto N., Katsuno Y., Kawasaki S., Nakajima Y., Kajiro M., Komatsu Y., Fujimura A., Hirota R., Murayama A., Kimura K., Imamura T., Yanagisawa J. Estrogen inhibits transforming growth factor beta signaling by promoting Smad2/3 degradation. J Biol Chem. 2010 May 7; 285 (19): 14747–55. doi: [10.1074/jbc.M109.093039](http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.093039).
7. Matsuda T., Yamamoto T., Muraguchi A., Saatcioglu F. Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. J Biol Chem. 2001 Nov 16; 276: 42908–1.
8. Wu L., Wu Y., Gathings B., Wan M., Li X., Grizzle W., Liu Z., Lu C., Mao Z., Cao X. Smad4 as a transcription corepressor for estrogen receptor alpha. J Biol Chem. 2003 Apr 25; 278 (17): 15192–200.
9. Gao N., Zhai Q., Li Y., Huang K., Bian D., Wang X., Liu C., Xu H., Zhang T. Clinical Implications of T β RII Expression in Breast Cancer. PLoS One. 2015 Nov 9; 10 (11): e0141412. doi: [10.1371/journal.pone.0141412](http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0141412).
10. Paiva C.E., Drigo S.A., Rosa F.E., Moraes Neto F.A., Caldeira J.R.F., Soares F.A., Rogatto S.R. Absence of transforming growth factor-b type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumours. Annals of Oncology. 2010; 21: 734–40. doi: [10.1093/annonc/mdp518](http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mdp518).
11. Busch S., Sims A.H., Stål O., Fernö M., Landberg G. Loss of TGF β receptor type 2 expression impairs estrogen response and confers tamoxifen resistance. Cancer Res. 2015 Apr 1; 75 (7): 1457–69. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-14-1583](http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1583).
12. Gilboa L., Wells R.G., Lodish H.F., Henis Y.I. Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor β receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. J Cell Biol. 1998 Feb 23; 140 (4): 767–77.
13. Chen T., Jackson C.R., Link A., Markey M.P., Colligan B.M., Douglass L.E., Pemberton J.O., Deddens J.A., Graff J.R., Carter J.H. Int7G24A variant of transforming growth factor-beta receptor type I is associated with invasive breast cancer. Clin Cancer Res. 2006 Jan 15; 12 (2): 392–7.
14. Chen C., Zhao K.N., Masci P.P., Lakhani S.R., Antonsson A., Simpson P.T., Vitetta L. TGF β isoforms and receptors mRNA expression in breast tumours: prognostic value and clinical implications. BMC Cancer. 2015 Dec 24; 15: 1010. doi: [10.1186/s12885-015-1993-3](http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1993-3).
15. de Kruijff E.M., Dekker T.J., Hawinkels L.J., Putter H., Smit V.T., Kroep J.R., Kuppen P.J., van de Velde C.J., ten Dijke P., Tollenaar R.A., Mesker W.E. The prognostic role of TGF- β signaling pathway in breast cancer patients. Ann Oncol. 2013 Feb; 24 (2): 384–90. doi: [10.1093/annonc/mds333](http://dx.doi.org/10.1093/annonc/mds333).
16. Song B., Margolin S., Skoglund J., Zhou X., Rantala J., Picelli S., Werelius B., Lindblom A. TGFBR1(* β 6A) and Int7G24A variants of transforming growth factor beta receptor 1 in Swedish familial and sporadic breast cancer. Br J Cancer. 2007 Oct 22; 97 (8): 1175–9. doi: [10.1038/sj.bjc.6603961](http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6603961) www.bjcancer.com.

Поступила 21.10.16
Принята в печать 16.01.17

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бабышкина Наталия Николаевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии и иммунологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: nbabyshkina@mail.ru. SPIN-код: 2738-9275.

Вторушин Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет; старший научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: wtorushin@rambler.ru. SPIN-код: 2442-4720.

Дронова Татьяна Анатольевна, аспирант Института биологии, Национальный исследовательский Томский государственный университет (г. Томск, Россия). E-mail: tanyadronova@mail.ru. SPIN-код: 3516-2517.

Крахмаль Надежда Валерьевна, ассистент кафедры патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Россия). E-mail: krakhmal@mail.ru. SPIN-код: 1543-6546.

Завьялова Марина Викторовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой патологической анатомии, Сибирский государственный медицинский университет; старший научный сотрудник отделения патологической анатомии и цитологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: zavyalovamv@mail.ru. SPIN-код: 1229-0323.

Цыганов Матвей Михайлович, младший научный сотрудник лаборатории онковирусологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: TsyganovMM@yandex.ru. SPIN-код: 1253-0240.

Паталяк Станислав Викторович, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отделения общей онкологии, Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: Patalyak@gmail.com. SPIN-код: 8497-1750.

Слонимская Елена Михайловна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая отделением общей онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук; профессор кафедры онкологии, Сибирский государственный медицинский университет (г. Томск, Россия). E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-код: 7763-6417.

Чердынцева Надежда Викторовна, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук (г. Томск, Россия). E-mail: nvch@oncology.tomsk.ru. SPIN-код: 5344-0990.

ROLE OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR RECEPTOR B I TYPE (TGF-βRI) IN THE PROGRESSION OF THE LUMINAL BREAST CANCER SUBTYPE

N.N. Babushkina^{1,2}, S.V. Vtorushin^{1,3}, T.A. Dronova², N.V. Krakhmal^{1,3},
M.V. Zavyalova^{1,2,3}, M.M. Tsyganov^{1,2}, S.V. Patalyak¹, E.M. Slonimskaya^{1,3},
N.V. Cherdyntseva^{1,2}

Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia¹

5, Kooperativny Street, 634009, Tomsk, Russia, e-mail: nbabushkina@mail.ru¹

National Research Tomsk State University, Tomsk, Russian Federation²

36, Lenina, Street, 634050, Tomsk²

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation³

2, Moskovsky Tract Street, 634050, Tomsk³

Abstract

Introduction. The crosstalk between the estrogen and growth factor receptors signaling may play an important role in the resistance to endocrine therapy. The aim of the study was to examine the relationship between the protein and receptor gene expression of transforming growth factor β type I (TGF-βRI) and its polymorphism with progression of luminal breast cancer patients treated by adjuvant tamoxifen. **Material and methods.** The study included 105 patients with luminal breast cancer (T₁₋₃N₀₋₃M₀), who had received adjuvant tamoxifen at a dose of 20 mg/day for at least 5 years. Patients who developed distant metastasis or recurrence after tamoxifen therapy were defined as tamoxifen resistance (TR) group, while distant metastasis-free patients were analyzed as tamoxifen sensitive (TS) group. TGF-βRI expression level was evaluated using immunohistochemistry. *TGF-βRI* gene expression and genotypes for rs334354 SNP were detected by a Real-time PCR. **Results.** We found high TGF-βRI gene expression in patients with luminal A subtype compared with luminal B breast cancer (p=0.050). The *Int7G24AA* and *Int7G24A* mutant carriers were more prevalent in luminal A breast cancer patients (p=0.019 and p=0.007, respectively). TGF-βRI protein expression level was significantly higher in the tamoxifen sensitive group compared to tamoxifen resistance breast cancer patients regardless of molecular subtypes (p=0.043). There was a trend for a tamoxifen sensitivity among luminal B breast cancer patients with a high TGF-βRI protein expression (p=0.090). **Conclusion.** TGF-βRI protein expression level can be a potential molecular marker of tamoxifen resistance in luminal breast cancer patients.

Key words: luminal breast cancer, endocrine therapy, tamoxifen, transforming growth factor B type I receptor (TGF-βRI), gene polymorphism.

REFERENCES

1. Stenina M.B., Frolova M.A. Breast cancer: the most important scientific events and the conclusions of the last years. Practical oncology. 2011; 12 (1): 6–11. [in Russian]
2. Semiglazov V.F., Paltuev R.M., Semiglazov V.V., Dashyan G.A., Semiglazova T.Y., Krivorotko P.V., Nikolaev K.S. General St. Gallen-2015 guidelines for the treatment of early breast cancer (adapted by the experts of the Russian Society of Breast Oncologists). Women Reproductive System Tumors. 2015; 11 (3): 43–60. doi:10.17650/1994-4098-2015-11-3-43-60. [in Russian]
3. Band A.M., Laiho M. Crosstalk of TGF-β and estrogen receptor signaling in breast cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2011; 16 (2): 109–15. doi: 10.1007/s10911-011-9203-7.
4. Derynck R., Zhang Y.E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling. Nature. 2003 Oct 9; 425 (6958): 577–84.
5. Kleuser B., Malek D., Gust R., Pertz H.H., Potteck H., Kleuser B., Malek D., Gust R., Pertz H.H., Potteck H. 17-Beta-estradiol inhibits transforming growth factor-beta signaling and function in breast cancer cells via activation of extracellular signal-regulated kinase through the G protein-coupled receptor 30. Mol Pharmacol. 2008 Dec; 74: 1533–43. doi: 10.1124/mol.108.046854.
6. Ito I., Hanyu A., Wayama M., Goto N., Katsuno Y., Kawasaki S., Nakajima Y., Kajiro M., Komatsu Y., Fujimura A., Hirota R., Murayama A., Kimura K., Imamura T., Yanagisawa J. Estrogen inhibits transforming growth factor beta signaling by promoting Smad2/3 degradation. J Biol Chem. 2010 May 7; 285 (19): 14747–55. doi: 10.1074/jbc.M109.093039.
7. Matsuda T., Yamamoto T., Muraguchi A., Saatcioglu F. Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. J Biol Chem. 2001 Nov 16; 276: 42908–1.
8. Wu L., Wu Y., Gathings B., Wan M., Li X., Grizzle W., Liu Z., Lu C., Mao Z., Cao X. Smad4 as a transcription corepressor for estrogen receptor alpha. J Biol Chem. 2003 Apr 25; 278 (17): 15192–200.
9. Gao N., Zhai Q., Li Y., Huang K., Bian D., Wang X., Liu C., Xu H., Zhang T. Clinical Implications of TβRII Expression in Breast Cancer. PLoS One. 2015 Nov 9; 10 (11): e0141412. doi: 10.1371/journal.pone.0141412.
10. Paiva C.E., Drigo S.A., Rosa F.E., Moraes Neto F.A., Caldeira J.R.F., Soares F.A., Rogatto S.R. Absence of transforming growth factor-β type II receptor is associated with poorer prognosis in HER2-negative breast tumours. Annals of Oncology. 2010; 21: 734–40. doi:10.1093/annonc/mdp518.
11. Busch S., Sims A.H., Stål O., Fernö M., Landberg G. Loss of TGFβ receptor type 2 expression impairs estrogen response and confers tamoxifen resistance. Cancer Res. 2015 Apr 1; 75 (7): 1457–69. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1583.
12. Gilboa L., Wells R.G., Lodish H.F., Henis Y.I. Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor β receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. J Cell Biol. 1998 Feb 23; 140 (4): 767–77.
13. Chen T., Jackson C.R., Link A., Markey M.P., Colligan B.M., Douglass L.E., Pemberton J.O., Deddens J.A., Graff J.R., Carter J.H. Int7G24A variant of transforming growth factor-beta receptor type I is associated with invasive breast cancer. Clin Cancer Res. 2006 Jan 15; 12 (2): 392–7.

14. Chen C., Zhao K.N., Masci P.P., Lakhani S.R., Antonsson A., Simpson P.T., Vitetta L. TGF β isoforms and receptors mRNA expression in breast tumours: prognostic value and clinical implications. *BMC Cancer*. 2015 Dec 24; 15: 1010. doi: 10.1186/s12885-015-1993-3.

15. de Kruijff E.M., Dekker T.J., Hawinkels L.J., Putter H., Smit V.T., Kroep J.R., Kuppen P.J., van de Velde C.J., ten Dijke P., Tollenaar R.A., Mesker W.E. The prognostic role of TGF- β signaling pathway in breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2013 Feb; 24 (2): 384–90. doi: 10.1093/annonc/mds333.

16. Song B., Margolin S., Skoglund J., Zhou X., Rantala J., Picelli S., Werelius B., Lindblom A. TGFBR1(* β 6A and Int7G24A variants of transforming growth factor beta receptor 1 in Swedish familial and sporadic breast cancer. *Br J Cancer*. 2007 Oct 22; 97 (8): 1175–9. doi: 10.1038/sj.bjc.6603961 www.bjcancer.com.

Received 21.10.16
Accepted 16.01.17

ABOUT THE AUTHORS

Babyshkina Natalia N., MD, PhD, Senior Research Scientist, Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: nbabyshkina@mail.ru. SPIN-code: 2738-9275.

Vtorushin Sergey V., MD, Professor, Department of Anatomical Pathology, Siberian State Medical University (Tomsk, Russia). E-mail: vtorushin@rambler.ru. SPIN-code: 2442-4720.

Dronova Tatiana A., postgraduate, National Research Tomsk State University (Tomsk, Russia). E-mail: tanyadronova@mail.ru. SPIN-code: 3516-2517.

Krakhmal Nadezhda V., MD, PhD, Assistant, Department of Anatomical Pathology, Siberian State Medical University (Tomsk, Russia). E-mail: krakhmal@mail.ru. SPIN-code: 1543-6546.

Zavyalova Marina V., MD, Professor, Senior Researcher, Department of Pathological Anatomy and Cytology, Tomsk Cancer Research Institute, Head of Pathological Anatomy Department, Siberian State Medical University (Tomsk, Russia). E-mail: zavyalovamv@mail.ru. SPIN code: 1229-0323.

Tsyganov Matvey M., Junior Research, Laboratory of Viral Oncology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: TsyganovMM@yandex.ru. SPIN-code: 1253-0240.

Patalyak Stanislav V., MD, PhD, Researcher, General Oncology Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: Patalyak@gmail.com. SPIN-code: 8497-1750.

Cherdyntseva Nadezhda V., Associate Member of Russian Academy of Sciences, PhD, Professor, Deputy Director for Basic Science, Head of Laboratory of Molecular Oncology and Immunology, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Medical Sciences (Tomsk, Russia). E-mail: nvch@oncology.tomsk.ru. SPIN-code: 5344-0990.

Slonimskaya Elena M., MD, Professor, Head of General Oncology Department, Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Medical Sciences. E-mail: slonimskaya@rambler.ru. SPIN-code: 7763-6417.