

# НЕКОТОРЫЕ ТКАНЕВЫЕ МАРКЕРЫ И МУЛЬТИГЕННЫЕ СИГНАТУРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: ПРОГНОЗ ЗАБОЛЕВАНИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЛЕКАРСТВЕННОМУ ЛЕЧЕНИЮ

Г.П. Генс, кандидат медицинских наук

Московский медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава России,  
Российская Федерация, 127473, Москва, Делегатская, д. 20

E-mail: gelena974@gmail.com

Прогнозирование клинических исходов рака молочной железы (РМЖ) является многоуровневым процессом и включает как клинко-анатомическую оценку распространенности заболевания, так и уровни экспрессии белков, ДНК и РНК. Данная работа посвящена применению в клинической практике традиционных маркеров, а также новых тканевых прогностических факторов и мультигенных сигнатур Oncotype DX и MammaPrint при РМЖ. Приведены результаты клинических исследований по применению химиотерапии, гормональной, а также таргетной терапии в зависимости от молекулярно-биологического подтипа РМЖ. Рассмотрены результаты оценки рисков прогрессирования болезни с помощью мультигенных сигнатур (21- и 70-генные панели). Приведены собственные исследования нового прогностического маркера РМЖ – многофункционального белка YB-1. Показано, что высокая экспрессия мРНК гена YB-1 ассоциирована с худшей безрецидивной выживаемостью как при однофакторном, так и многофакторном анализе и позволяет выявить группу больных высокого риска прогрессирования болезни. Также описано современное состояние исследований по применению некоторых новых маркеров, которые доказали свою значимость в прогнозе и предсказании эффективности лечения РМЖ, это – белки uPA, PAI-1 и микроРНК.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, мультигенные сигнатуры, мультифункциональный белок YB-1, Oncotype DX, MammaPrint, uPA, PAI-1

## SOME TISSUE MARKERS AND MULTIGENE SIGNATURES OF BREAST CANCER: PROGNOSIS AND DETERMINATION OF DRUG SENSITIVITY

G.P. Guens

Moscow State University of Medicine and Dentistry named after A.I. Evdokimov,  
Delegatskaya Str., 20, Moscow, Russian Federation, 127473

Prediction of clinical outcome of breast cancer (BC) is a multi-level process that includes the clinical and anatomical assessment both of the disease and the expression levels of proteins, DNA and RNA. This article discusses the application of traditional and new tissue prognostic markers in the clinical practice, as well as multigene signatures – Oncotype DX and MammaPrint. There are presented results of clinical studies on the use of chemotherapy, hormonal therapy, and targeted therapy, depending on the molecular biological subtypes of BC. In addition, there is represented the author's own research on a new prognostic marker of BC – a multifunctional protein YB-1. High mRNA expression of YB-1 gene is associated with a worse disease-free survival in both univariate and multivariate analysis and allows to identify a group of patients who are at high risk of the disease progression. Also author describes the current state of research on the application of new markers – proteins uPA, PAI-1 and microRNA for disease prognosis.

**Key words:** breast cancer, multifunctional protein YB-1, multigene signatures, Oncotype DX, MammaPrint, uPA, PAI-1

Рак молочной железы (РМЖ) – опухоль, проходящая в своем развитии несколько стадий: сначала – протоковая гиперплазия и пролиферация с последующей эволюцией в карциному *in situ*, затем – в инвазивную карциному и, наконец, в метастатическую болезнь. С учетом вариабельности клинических проявлений развития заболевания насущной проблемой является идентификация маркеров, которые способны предсказывать биологическое поведение РМЖ.

Согласно рабочей группе и Консорциуму по биомаркерам Американского института здоровья, моле-

кулярные маркеры – это объективная характеристика тканей и индикатор нормальных либо патогенных биологических процессов или фармакологического ответа на терапевтические воздействия [1].

Тканевые опухолевые маркеры применяются в онкологической практике для диагностики заболевания, оптимального стадирования болезни, некоторые из них служат основой для принятия решения о тактике лечения, оценке терапевтического ответа, диагностике рецидивов, отдаленных метастазов и прогноза. Идентификация новых маркеров ложится в основу развития перспективных лечебных подходов.

Традиционные маркеры для РМЖ – гормональные рецепторы опухоли: рецепторы эстрогенов (ER) и прогестерона (PR), экспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2 и маркер пролиферации Ki-67.

ER и PR являются транскрипционными факторами, которые опосредуют взаимодействия циркулирующих ER и PR. Оба рецептора существуют, как известно, в виде 2 разных изоформ: ER $\alpha$  и ER- $\beta$ 42 – для ER и PR $\alpha$  и PR $\beta$ 43 – для PR. Однако для процессов развития РМЖ и канцерогенеза только ER- $\alpha$ , по-видимому, играют существенную роль. Рецепторный статус считают сильным предиктором ответа на гормональную терапию у пациенток с РМЖ. Как при ранней, так и при метастатической болезни у пациенток с гормонрецепторположительными опухолями существенно выше вероятность ответа на гормональную терапию, чем у пациенток, у которых эти рецепторы отсутствуют. На протяжении 5 лет после установления диагноза у пациенток с ER-положительными опухолями исход лучше, чем с ER-негативным РМЖ. Однако после этого периода «благоприятное» влияние ER постепенно исчезает, и опухоли могут прогрессировать через 10–20 лет после первичной диагностики и лечения. Примерно 30–40% пациенток с ER-положительными опухолями не отвечают на эндокринную терапию, – в отличие от некоторых больных с ER-негативными опухолями. Еще одно ограничение ER как фактора прогноза – это то, что прогностический эффект ER имеет весьма низкую ценность при РМЖ с негативными регионарными лимфатическими узлами.

Ген рецептора HER2 – наиболее часто встречающийся при РМЖ амплифицированный протоонкоген, который кодирует трансмембранный белок, принадлежащий к семейству эпидермального фактора роста. Это ген амплифицирован или гиперэкспрессирован у 15–30% пациенток с РМЖ. Гиперэкспрессия/амплификация HER2 является предиктором ответа на терапию трастузумабом. Известно, что почти 50% HER2-положительных пациенток не отвечают на это лечение, что послужило поводом для изучения новых подходов к лечению этой группы больных РМЖ.

Выдающаяся эффективность новой HER2-нацеленной терапии – пертузумаб и Т-DM1 (трастузумаба эмтансин), которые назначают в комбинации с трастузумабом и с химиотерапией (ХТ) в случае раннего РМЖ, – позволяет достичь ответа у 70% пациенток. Это может означать, что проблема резистентности опухолей к HER2-терапии (важная область исследований в последние 5–10 лет) в настоящее время утрачивает свою значимость.

С другой стороны, значительная стоимость терапии и клинические риски, особенно кардиотоксичность HER2-терапии в комбинации с антрациклинами, подчеркивает важность отбора пациенток, которые не нуждаются в цитостатических препаратах. Впечатляющий 20% полный патоморфологиче-

ский ответ после терапии трастузумабом и пертузумабом без применения ХТ свидетельствует о том, что уменьшение использования цитостатиков в лечении HER2-зависимого РМЖ возможно для определенной группы пациенток [2]. С появлением многокомпонентной высокоэффективной HER2-таргетной терапии самый важный клинический вопрос: как комбинировать и в какой последовательности применять эти препараты для максимально эффективного лечения? И, возможно, наряду с продолжением исследований по изучению предиктивных маркеров лекарственного эффекта, хорошим практическим биомаркером может являться (как в случае тройного негативного РМЖ) патоморфологический ответ, который предскажет, кто из пациенток нуждается в дальнейшей адъювантной терапии.

Антиген Ki-67, так называемый пролиферативный индекс, является лабильным ядерным белком, тесно связанным с клеточным циклом. Ki-67 экспрессируется в G1-, S-, G2- и M-фазах клеточного цикла пролиферирующих клеток. Прогностическую и предиктивную роль этого белка изучали во многих исследованиях [3]; в настоящее время большинство авторов считают, что этот биомаркер может служить прогностическим фактором, который помогает в принятии терапевтических решений, в частности, при РМЖ. Однако отсутствие стандартизованных методик определения этого маркера может приводить к ошибкам и неправильным выводам.

ER, PR, HER2-статус и индекс Ki-67 являются суррогатными маркерами, на основании которых в рутинной практике РМЖ классифицируют несколько молекулярно-биологических подтипов – люминальные подгруппы, HER2-положительная и базальные подгруппы РМЖ. Появление этой новой молекулярной классификации неполностью объясняет биологическое поведение опухоли и предсказывает ответ на лекарственное лечение. Последние ключевые работы показывают возможность дополнительного разделения опухолей в пределах уже известных подгрупп РМЖ [4]. Сегодня прогноз болезни и предсказание ответа на лечение можно осуществлять с помощью генных сигнатур опухоли (молекулярного портрета). Среди коммерчески доступных мультигенных панелей отметим 21-генный анализ (Oncotype DX), 70-генную сигнатуру MammaPrint, эффективность клинического применения которых оценена в проспективных клинических исследованиях TAILORx и MINDACT [5–7].

Анализ Oncotype DX оценивает 21 ген (16 целевых генов РМЖ и 5 контрольных – референсных генов). Oncotype DXTM основан на проведении нескольких полимеразных цепных реакций (ПЦР) в реальном времени на генетическом материале, полученном из парафиновых блоков. Геномный анализ Oncotype DXTM (Genomic Health) с 2007 г. рекомендован к применению Американским обществом клинической онкологии (ASCO) [8]. Этот тест применяют у пациенток с ER-положительными опухолями молочной

железы и негативными лимфатическими узлами. Он определяет вероятность рецидива заболевания у женщин с РМЖ на ранних стадиях и оценивает возможную выгоду от применения ХТ и гормонотерапии.

Количественным выражением этого анализа является вероятность рецидива РМЖ, выраженная числом баллов (от 0 до 100) по шкале рецидива, в течение 10 лет с постановки первоначального диагноза. Чем ниже количество баллов, тем менее вероятен рецидив. Это одновременно прогностический и предиктивный тест, так как он показывает вероятность рецидива (прогноз болезни) и выгоду от назначения адъювантного лечения тамоксифеном, а не цитостатическими препаратами. Пациенткам с высоким риском по шкале рецидива показана адъювантная ХТ с последующей гормонотерапией, пациенткам с низким риском – только адъювантная гормонотерапия [9, 10].

70-генная сигнатура MammaPrint, первоначально оцениваемая на основе анализа 70 генов свежзамороженной опухолевой ткани, в настоящее время адаптирована к анализу парафиновых блоков РМЖ T1-T2 без метастазов в лимфатических узлах с помощью ДНК-микрочипов. Тест позволяет выявить опухоли с низким («благоприятная» сигнатура) и с высоким («неблагоприятная» сигнатура) риском рецидива [11]. MammaPrint применяют для предсказания эффективности адъювантной ХТ, а также чувствительности к неоадъювантной ХТ – сегодня это предмет клинических исследований [12].

Помимо этих 2 наиболее часто применяемых генетических анализов, существуют и другие экспрессионные панели генетических тестов. Каждый из этих тестов может выявить прогностически благоприятную форму РМЖ, однако генные наборы, применяемые в этих сигнатурах, перекрываются лишь в незначительной части и потому данные тесты могут предсказывать противоречивые значения риска для одной и той же пациентки [13].

В связи с этим нельзя недооценивать значение отдельных индивидуальных молекулярных маркеров, которые вовлечены во многие сигнальные пути опухолевой прогрессии и выживания раковой клетки в организме. Рассмотрим некоторые из важнейших новых маркеров, которые доказали свою значимость в прогнозе и предсказании эффективности лечения РМЖ.

uPA и PAI-1 – белки, способствующие опухолевой инвазии и процессу метастазирования. Более чем 20 независимых исследований показали, что высокий уровень uPA или PAI-1 при РМЖ ассоциирован с агрессивностью опухоли и плохим исходом заболевания. Очень важно, что прогностическая значимость этих белков оценена в исследованиях с высшим уровнем доказательности – I. Валидность uPA и PAI-1 изучена в мультицентровых рандомизированных проспективных исследованиях в 14 клинических центрах Германии, а объединенный анализ включил данные из 18 различных центров Европы.

Главное клиническое применение этих маркеров состоит в отборе пациентов с РМЖ-негативными лимфатическими узлами и с низким уровнем uPA и PAI-1. У этих пациенток хороший прогноз, поэтому выгода от проведения ХТ в этой когорте мала. Таким образом, эти больные могут избежать токсических эффектов лечения, что существенно снизит стоимость лечения.

Еще один кандидат на роль нового диагностического и прогностического маркера и потенциальную терапевтическую мишень – это микро-РНК. В последние десятилетия становится все больше доказательств того, что микро-РНК (miRNA) могут служить тканевыми маркерами для классификации и оценки прогноза РМЖ [14]. Микро-РНК могут присутствовать в цельной крови, а также в сыворотке и плазме крови, но происхождение циркулирующей микро-РНК остается неясным. Предполагают, что опухольассоциированная микро-РНК может высвобождаться в кровяное русло при гибели опухолевых клеток или их лизисе; существует мнение, что микро-РНК может высвобождаться экзосомами опухолевых клеток [15]. Исследования показали, что микро-РНК играют основную роль в наиболее критических биологических событиях жизни клетки – таких, как пролиферация, дифференцировка, апоптоз, трансдукция клеточных сигналов и процесс канцерогенеза [16].

Многофункциональный белок YB-1 является ДНК/РНК-связывающим белком, который регулирует трансляцию в цитоплазме клеток, а также транскрипцию различных генов и репарацию ДНК в ядрах клеток. В 2011 г. Д. Ханахан и Р. Вайнберг опубликовали свою знаменитую работу, в котором обобщили все известные биологические особенности злокачественной опухоли [17]. На сегодняшний день есть немало доказательств того, что YB-1 ассоциирован со всеми признаками опухоли. Он регулирует пролиферацию клеток [18], участвует в предупреждении апоптоза, способствует репликативному бессмертию и геномной нестабильности, регулирует ангиогенез, играет роль в инвазии клеток и метастазировании опухоли, способствует процессу воспаления [19]. Помимо этого, белок YB-1 играет заметную роль в возникновении множественной лекарственной устойчивости опухоли.

Сегодня существует большое количество работ по изучению роли YB-1 при РМЖ. Систематический обзор проведенных клинических исследований, оценивающих прогностическую значимость YB-1, показывает, что по общей выживаемости качество доказательств прогностического значения ядерной локализации белка YB-1 можно оценить как уровень В (класс II (В) – это рандомизированные и контролируемые исследования, при которых статистические данные построены на небольшом числе больных). Также важно отметить недостаточность проспективных исследований – их до 2012 г. было только 2 [20].

Недавно завершилось начатое в 2005 г. собственное проспективное исследование прогностической значимости и ядерной локализации белка YB-1 [21], а также экспрессии мРНК гена YB-1 в группе больных РМЖ. Данные показывают, что высокая экспрессия мРНК гена YB-1 ассоциирована с худшей безрецидивной выживаемостью как в однофакторном ( $p=0,03$ ), так и в многофакторном ( $p=0,025$ ) анализе [22]. Более того, экспрессия мРНК гена YB-1 позволяет выявить группу высокого риска рецидива среди больных с малыми опухолями (T1–T2) и люминальным подтипом РМЖ. Далее экспрессия мРНК YB-1 вошла в число 7 критических параметров из 32 для прогнозирования смерти от РМЖ при построении математической модели исхода заболевания на основе Байесовских сетей [23].

Таким образом, белок YB-1 может быть постоянным молекулярным маркером опухолевой прогрессии и служить в клинике не только как фактор прогноза, но и как мишень для противоопухолевой терапии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогнозирование исходов РМЖ является многоуровневым процессом и включает как клинико-анатомическую оценку распространенности заболевания (TNM), так и уровни экспрессии белков (иммуногистохимические исследования), ДНК (FISH-реакции) и РНК (генные сигнатуры). Изучение экспрессии генов внесло значительный вклад в понимание гетерогенности РМЖ, но их включение в рутинную клиническую практику – процесс медленный, ограниченный в различных аспектах.

Гены в пределах сигнатур часто не обладают биологической значимостью, а потому не могут быть использованы для таргетной терапии. Они также пока не продемонстрировали значительного превосходства по сравнению с классическими/традиционными прогностическими факторами. На практике необходим комплексный подход, который объединил бы различные методы и обеспечил врача и пациентку индивидуальной прогностической информацией.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mishra A., Verma M. Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? *Cancers*. 2010; 2 (1): 190–208.
- Gianni L., Pienkowski T., Im Y.H. et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2012; 13: 25–32.
- Luporsi E., André F., Spyrtatos F. et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast Cancer Res. Treat.* 2012; 132 (3): 895–915.
- Sortie T., Tibshirani R., Parker J. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100 (14): 8418–23.
- Cardoso F., Piccart-Gebhart M., Van't Veer L., Rutgers E; TRANSBIG Consortium. The MINDACT trial: the first prospective clinical validation of a genomic tool. *Mol. Oncol*. 2007; 1: 246–51.
- Cardoso F., Van't Veer L., Rutgers E. et al. Clinical application of the 70-gene profile: the MINDACT trial. *J. Clin. Oncol*. 2008; 26: 729–35.
- Sparano J.A. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clin. Breast Cancer*. 2006; 7: 347–50.
- Harris L., Fritsche H., Mennel R. et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J. Clin. Oncol*. 2007; 25 (33): 5287–312.
- Paik S., Shak S., Tang G. et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med*. 2004; 351 (27): 2817–26.
- van't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002; 415 (6871): 530–6.
- Tang G., Shak S., Paik S. et al. Comparison of the prognostic and predictive utilities of the 21-gene Recurrence Score assay and Adjuvant! for women with node-negative, ER-positive breast cancer: results from NSABP B-14 and NSABP B-20. *Breast Cancer Res. Treat.* 2011; 127 (1): 133–42.
- Gluck S., de Snoo F., Tian S. Response to neo-adjuvant chemotherapy and outcomes for I-SPY 1 patients stratified by the 70-gene prognosis signature (MammaPrint) and molecular subtyping (BluePrint). Presented at: 34th San Antonio Breast Cancer Symposium. San Antonio, TX, USA, 6–10 December 2011.
- Kelly C.M., Bernard P.S., Krishnamurthy S. et al. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX<sup>®</sup>) and the PAM50 breast cancer intrinsic Classifier™ in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncologist*. 2012; 17: 492–8.
- Fu S.W., Chen L., Man Y.G. miRNA biomarkers in breast cancer detection and management. *J. Cancer*. 2011; 2: 116–22.
- Chin L.J., Slack F.J. A truth serum for cancer microRNAs have major potential as cancer biomarkers. *Cell Res*. 2008; 18 (10): 983–4.
- Guarnieri D.J., Dileone R.J. MicroRNAs: a new class of gene regulators. *Ann. Med*. 2008; 40 (3): 197–208.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646–74.
- Yu Y.N., Yip G.W., Tan P.H. et al. Y-box binding protein 1 is up-regulated in proliferative breast cancer and its inhibition deregulates the cell cycle. *Int. J. Oncol*. 2010; 37 (2): 483–92.
- Елисеєва И.А., Ким Е.Р., Гурьянов С.Г., Овчинников Л.П., Лябин Д.Н. Y-бок-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции. Успехи биологической химии. 2011; 51: 65–132. (Eliseeva I.A., Kim E.R., Guryanov S.G., Ovchinnikov L.P., Lyabin D.N. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 2011; 51: 65–132 (in Russian))
- Генс Г.П., Федяева В.К., Реброва О.Ю. Систематический обзор оригинальных исследований (с определением их методологического качества) по прогностическим свойствам белка YB-1 в отношении общей и безрецидивной выживаемости больных раком молочной железы. Российский онкологический журнал. 2015; 20 (1): 4–19. (Gens G.P., Fedyaeva V.K., Rebrova O.Yu. Systematic review of prognostic value of the YB-1 protein in breast cancer patients: overall and progression free survival. *Russian Journal of Oncology*. 2015; 20 (1): 4–19 (in Russian))
- Генс Г.П., Моисеева Н.И., Рыбалкина Е.Ю., Стромская Т.П., Вайман А.В., Овчинников Л.П., Ставровская А.А. Внутриклеточная локализация белка YB-1 и химиотерапия опухолей молочной железы. Российский биотерапевтический журнал. 2010; 4: 77–84. (Gens G.P., Moiseeva N. I., Rybalkina E. Yu., Stromskaya T.P., Vaiman A. V., Ovchinnikov L.P., Stavrovskaya A.A. Intracellular localization of YB-1 and chemotherapy of breast cancer. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal*. 2010; 4: 77–84 (in Russian))
- Stavrovskaya A.A., Stromskaya T.P., Rybalkina E. Yu., Moiseeva N. I., Vaiman A. V., Gurjanov S. G., Ovchinnikov L. P., Guens G. P. YB-1 protein and multidrug resistance of tumor cells. *Current signal transduction therapy*. 2012; 7 (3): 237–46.
- Генс Г.П., Сулимов А.В., Моисеева Н.И., Овсий О.Г., Вельшер Л.З., Рыбалкина Е.Ю., Селезнева И.И., Савкин И.А., Сулимов В.Б. Поиск подходов к прогнозированию исходов рака молочной железы с помощью байесовских сетей. Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2014; 5: 37–46. (Gens G.P., Sulimov A.V., Moiseeva N.I., Ovsij O.G., Vel'sher L.Z., Rybalkina E. Yu., Selezneva I.I., Savkin I.A., Sulimov V.B. Bayesian networks in breast cancer prognosis. *Onkologiya. Zhurnal imeni P.A. Gerzena*. 2014; 5: 37–46 (in Russian))

Поступила 27 января 2015 г.