

На правах рукописи

Паталяк Станислав Викторович

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГОРМОНОТЕРАПИИ У ПАЦИЕНТОК
С ЛЮМИНАЛЬНЫМ ТИПОМ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 – онкология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Томск-2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Томский научно-исследовательский институт онкологии»

Научный руководитель: Слонимская Елена Михайловна,
доктор медицинских наук, профессор

Научный консультант: Вторушин Сергей Владимирович,
доктор медицинских наук, доцент

Официальные оппоненты: Константинова Мария Михайловна,
доктор медицинских наук,
заместитель директора по лечебной работе,
главный врач ФГБУ «Институт
хирургии им. А.В. Вишневского»
Минздрава России

Надеев Александр Петрович,
доктор медицинских наук, профессор
кафедры патологической анатомии ГБОУ
ВПО «НГМУ» Минздрава России

Ведущая организация – Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, г. Москва

Защита состоится «___» _____ 2014 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 001.032.01 при ФГБНУ «Томский научно-исследовательский институт онкологии» (634009, г. Томск, пер. Кооперативный, 5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Томский НИИ онкологии» www.oncology.tomsk.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного сов
доктор медицинских наук, профессор



Фролова И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой гетерогенную группу опухолей. Согласно молекулярно-генетической классификации, предложенной Perou С.М. и Sorlie Т. в 2001 году, одним из основных критериев разделения является наличие в опухолевой ткани рецепторов к эстрогену и прогестерону (Perou С.М. et al., 2001). Опухоли, экспрессирующие рецепторы, относятся к люминальным и составляют, по данным ряда авторов, 70–80% всех случаев рака молочной железы (Massarweh S., 2006; Sihto H. et al., 2008; Deeset E.C. et al., 2013).

Среди люминальных раков молочной железы выделяют 3 основных подтипа: люминальный А, характеризующийся низкой пролиферативной активностью опухоли ($Ki-67 < 20\%$), люминальный В, отличающийся высокой пролиферативной активностью ($Ki-67 \geq 20\%$), и так называемый трижды позитивный рак, при котором отмечается гиперэкспрессия Her-2/neu (Winer E.P., 2011; Goldhirsch A. et al., 2013). Показано, что люминальный подтип А обладает наилучшим прогнозом, но при этом отмечается его низкая чувствительность к химиотерапии, а следовательно, добавление этого компонента лечения не приводит к достоверному увеличению показателей общей и безметастатической выживаемости (Kröger N. et al., 2006; Hortobagyi G.N., 2011). Люминальный подтип В РМЖ предполагает назначение системной цитостатической терапии. Гиперэкспрессия онкопротеина Her-2/neu обуславливает необходимость включения в комбинированное лечение, наряду с химиотерапией и эндокринотерапией, таргетных препаратов (трастузумаб, лапатиниб) (Perou С.М., 2005; Baselga J., 2011).

Основным системным компонентом лечения пациенток с люминальным РМЖ независимо от подтипа является гормонотерапия. Ее действие может быть направлено как на снижение уровня эстрогенов в крови и ткани опухоли, что достигается при использовании агонистов ЛГРГ (золадекс) или ингибиторов ароматазы (летрозол, анастрозол и др.), так и непосредственно на рецепторы эстрогенов альфа ($ER\alpha$), что реализуется применением препаратов группы антиэстрогенов (тамоксифен, фулвестрант и др.) (Корман Д.Б., 2010; Tung N., 2013). Выбор варианта гормонотерапии обусловлен состоянием менструальной функции. Так, пациенткам с сохранной менструальной функцией показан прием тамоксифена, тогда как для больных, находящихся в состоянии постменопаузы, более предпочтительны препараты, относящиеся к ингибиторам ароматазы (Семиглазов В.Ф. и др., 2011; Lonning P.E. et al., 2013). Однако по данным обобщенного метаанализа двух крупных рандомизированных исследований (АТАС и BIG 1-98), проведенного в 2010 г., применение ингибиторов ароматазы у пациенток в постменопаузе позволяет увеличить безрецидивную выживаемость и снизить частоту побочных эффектов по сравнению с тамоксифеном, но не ведет к увеличению общей выживаемости (Dowsett M. et al., 2010). Таким образом, тамоксифен остается базисным препаратом для проведения гормонотерапии люминального рака молочной железы (Hortobagyi G.N., 2011; Deeset E.C. et al., 2013).

Несмотря на достаточно благоприятные характеристики группы люминальных раков и наличие у них мишени для терапевтического воздействия, у части больных отмечается неэффективность проводимой гормонотерапии. Ряд авторов указывает на то, что у 10–20% пациентов на фоне адьювантной эндокринотерапии тамоксифеном наблюдается прогрессирование заболевания уже в первые 12 мес, а в последующие

годы это число возрастает до 20–40 % (Ali S. et al., 2002; Massarweh S. et al., 2006; Le Romancer M. et al., 2011).

В настоящее время проводятся исследования, направленные на поиск причин неэффективности гормонотерапии. В качестве возможных рассматриваются различные варианты формирования резистентности к тамоксифену: изучается структура рецепторов эстрогенов, а также факторы, сопряженные с их активацией (Schiff R., 2006; Stanway S.J. et al., 2007; Le Romancer M. et al., 2011).

Активация ER α осуществляется двумя основными путями. Классический геномный путь реализуется посредством воздействия эстрадиола на рецептор в цитоплазме, транслокации в ядро, связывания с ДНК и запуска процессов пролиферации клетки. Отличие неклассического геномного пути активации состоит в опосредованном (через запуск каскада PI3K/Akt/mTOR) воздействии на рецепторы эстрогенов факторов роста (EGF, Her-2/neu, TGF- β) (Massarweh S., 2006; Le Romancer M. et al., 2011).

Реализация того или иного пути может определяться и структурой самих рецепторов эстрогенов. Согласно современным представлениям ER α состоят из 5 доменов, наиболее изученными из которых являются центры активации AF-1 и AF-2 (Chanrion M. et al., 2008; Somlo G. et al., 2008). Классический геномный путь реализуется посредством связывания эстрадиола с доменом AF-2, а неклассический путь – через связывание белков регуляции клеточного цикла с центром AF-1 (Horlings H.M. et al., 2010; Le Romancer M. et al., 2011). В ряде клинико-экспериментальных исследований показано, что терапевтическое действие тамоксифена осуществляется посредством связывания и блокирования только домена AF-2. При этом домен AF-1 остается свободным и, следовательно, способен активироваться ростовыми факторами (Mascrez V. et al., 2001; Me´rot Y. et al., 2004; Jordan V.C., 2014). С этих позиций изучение ультраструктуры рецепторов эстрогенов является важным для понимания ее роли в формировании резистентности к проводимой терапии.

Реализация воздействия рассмотренных путей активации на ER α в конечном итоге приводит к индукции белков-регуляторов митоза клетки – циклинов. Циклин D1 является первым пусковым звеном в регуляции клеточного деления и в то же время рассматривается как конечный результат пролиферативного действия факторов роста (Robin L. Kilker, 2006; Arnold A. et al., 2012). Рядом исследователей показана возможность циклина D1 совместно с кофактором SRC-1 связываться с центром AF-1 рецепторов эстрогенов и активировать их по лиганднезависимому типу (Rudas M., 2008; Treilleux I. et al., 2013), тем самым приводя к неэффективности терапии тамоксифеном.

В качестве еще одной из возможных причин резистентности обсуждается наличие изменений в нуклеотидной последовательности геномной ДНК самих ER α – точечных мутаций или однонуклеотидных полиморфизмов. Однонуклеотидные полиморфизмы в кодирующей области гена эстрогенового рецептора (ESR1) приводят к изменению функциональных характеристик белка, поскольку полиморфными оказываются наиболее важные участки – функциональные домены активации транскрипции AF-1 и AF-2. Недавние исследования свидетельствуют, что значимыми являются полиморфизм в первом экзоне гена ESR1 (rs2077647), который локализуется в A/B-домене, что структурно соответствует лиганднезависимой функциональной области транскрипционной активации AF-1, и полиморфизм rs2228480 (594Thr) в 8-м экзоне гена ESR1, который располагается в E/F-регионе, что соответствует лигандзависимой функциональной области транскрипции AF-2 (Hamaguchi M., 2008; Shian-

ling Ding, 2010). Так, точечные мутации в 8-м экзоне гена ESR1 делают невозможным связывание тамоксифена с центром AF-2, тем самым обуславливая его неэффективность, а следовательно, нецелесообразность антиэстрогенной терапии (Anghel A. et al., 2010).

Таким образом, отсутствие эффекта от адъювантной гормонотерапии тамоксифеном может быть связано как с наличием точечных мутаций гена ESR1, так и с возможностью реализации разных путей активации рецепторов эстрогенов. С представленных позиций изучение данных аспектов является актуальным научным направлением.

Цель исследования. Изучить эффективность комбинированного лечения с использованием адъювантной гормонотерапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы в зависимости от клинико-морфологических и молекулярно-генетических характеристик опухоли.

Задачи исследования

1. Проанализировать отдаленные результаты комбинированного лечения больных люминальным типом рака молочной железы в зависимости от основных клинико-морфологических параметров (возраст, состояние менструального цикла, распространенность процесса, гистотип опухоли, степень злокачественности, уровень пролиферативной активности).
2. Оценить влияние степени и интенсивности экспрессии рецепторов эстрогенов, а также характера их распределения в опухоли на показатели безметастатической выживаемости.
3. Изучить уровень экспрессии рецепторов факторов роста (EGFR, TGF- β R) и белка регулятора клеточного цикла циклина D1 в ткани опухоли больных люминальным раком молочной железы и проанализировать их сопряженность с исходом заболевания.
4. Исследовать частоту полиморфизмов в 1-м и 8-м экзонах гена рецепторов эстрогенов и сопоставить ее с экспрессией рецепторов к половым гормонам, факторам роста и эффективностью лечения.
5. Определить значимость изучаемых параметров опухоли в отношении исхода заболевания и создать математическую модель прогнозирования эффективности адъювантной гормонотерапии тамоксифеном у больных люминальным раком молочной железы.

Научная новизна. Впервые продемонстрирована роль гетерогенного характера распределения рецепторов эстрогенов альфа в сочетании с классическими показателями их экспрессии в формировании резистентности к проводимой антиэстрогенной терапии тамоксифеном.

Показано высокое прогностическое значение экспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста 1 в ткани опухоли больных люминальным раком молочной железы в отношении неэффективности адъювантной гормонотерапии тамоксифеном.

Впервые отмечена повышенная частота встречаемости полиморфизма в 8-м экзоне гена ESR1 у пациенток с прогрессированием заболевания на фоне проводимой антиэстрогенной терапии тамоксифеном, при этом мутантный генотип опухоли ассоциировался с гетерогенным характером распределения рецепторов эстрогенов

альфа. Выявлена сопряженность гиперэкспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста 1 с наличием мутантного аллеля в 1-м экзоне гена рецепторов эстрогенов альфа.

На основании определения значимых молекулярно-генетических параметров опухоли впервые разработана модель логистической регрессии, позволяющая с высокой степенью вероятности прогнозировать ожидаемую эффективность антиэстрогенной терапии тамоксифеном у пациенток с люминальным типом рака молочной железы.

Практическая значимость. Выявлены дополнительные информативные параметры, такие как характер распределения ER α , особенности их ультраструктуры и экспрессия рецепторов EGFR в ткани опухоли больных люминальным раком молочной железы, которые ассоциированы с эффективностью гормонотерапии тамоксифеном. Определение этих показателей в биопсийном и/или операционном опухолевом материале позволит индивидуализированно подойти к назначению препарата. Разработана модель логистической регрессии, которая дает возможность с чувствительностью 85% и специфичностью 65% прогнозировать ожидаемую эффективность антиэстрогенной терапии тамоксифеном.

Основные положения, выносимые на защиту

Гетерогенный характер распределения рецепторов эстрогенов альфа в ткани опухоли больных люминальным раком молочной железы связан со снижением эффективности проводимой антиэстрогенной терапии тамоксифеном.

Экспрессия рецепторов EGFR в ткани опухоли больных, принимающих тамоксифен, сопряжена с неблагоприятным исходом заболевания.

Полиморфизм в 8-м экзоне гена ESR1 ассоциирован с гетерогенным характером распределения рецепторов и достоверно чаще встречается при прогрессировании заболевания на фоне терапии тамоксифеном.

Апробация работы. Основные положения и результаты научных исследований доложены и обсуждены на VIII и IX конференциях молодых ученых-онкологов, посвященных памяти академика РАМН Н.В. Васильева, «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической онкологии» (Томск, 2013, 2014); на всероссийской научно-практической конференции «Научно-практические аспекты современной онкологии» (Красноярск, 2013); ежегодном международном симпозиуме AACR «Использование достижений таргетного лечения» (Сан-Диего, США, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК.

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в лечении пациентов, наборе клинического материала, в проведении исследований и оценке их результатов, подготовке научных публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 91 странице машинописного текста и состоит из введения, трех разделов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована

23 таблицами и 13 рисунками. Список литературы содержит 173 источника, из них 27 отечественных и 146 иностранных.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 97 пациенток с люминальным типом рака молочной железы стадии T₁₋₂N₀₋₁M₀, получавших лечение в условиях ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН г. Томска (n = 85) и КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» г. Барнаула (n = 12) с 2002 по 2010 гг. Сроки наблюдения за больными составили от 13 до 130 мес, средний срок – (49±23,6) мес.

Возраст больных варьировал от 38 до 76 лет, средний – (54,8±0,9) года. Из пациенток, включенных в исследование, 55 находились в состоянии менопаузы, у 42 менструальный цикл был сохранен.

У всех больных диагноз рака молочной железы подтвержден морфологически (по данным трепан-биопсии). Опухоли были представлены инвазивной карциномой неспецифического типа. Высокодифференцированные опухоли (G1) наблюдались у 39 (40,3%) пациенток, умереннодифференцированные (G2) – у 55 (56,7%), низкая степень дифференцировки первичной опухоли (G3) выявлена у 3 (3%) пациенток.

Стадия заболевания оценивалась согласно международной классификации по системе TNM (7 издание AJCC, 2009 г.). У 35 (36%) пациенток установлена I стадия заболевания, у 47 (48,5%) – IIА стадия, у 15 (15,5%) – IIВ стадия.

Все больные получали комбинированное лечение в объеме оперативного вмешательства, а также лучевой и химиотерапии по показаниям. Органосохраняющее оперативное вмешательство (радикальная или секторальная резекция молочной железы с аксиллярной лимфодиссекцией) выполнено 51 больной, радикальная мастэктомия – 46 больным. Адювантная химиотерапия в виде 4–6 курсов по схеме FAC проведена 32 (33%) пациенткам. Дистанционная лучевая терапия назначалась после органосохраняющих оперативных вмешательств и при мультицентричном характере роста опухоли и была выполнена 59 пациенткам. Обязательным компонентом адъювантного лечения для всех больных был прием тамоксифена в течение 5 лет в стандартной дозировке (20 мг / сут). Неoadъювантное лечение не проводилось.

Отдаленные результаты лечения оценивались по факту наличия прогрессии в виде появления отдаленных метастазов. В зависимости от этого были сформированы 2 группы пациентов: I группа – без признаков прогрессирования (n = 60), II группа – с прогрессированием заболевания (n = 37).

Все случаи прогрессирования были отмечены на фоне адъювантной терапии тамоксифеном. Среднее время до прогрессирования составило (28,5±17,8) мес. Исследуемые группы пациенток были сопоставимы по стадии заболевания и объему проведенного специализированного лечения (таблица 1).

Для решения поставленных задач выполнялось определение рецепторного и Her-2/neu-статуса в опухолевой ткани. У всех пациенток опухоли молочных желез были люминальными, т.е. имели позитивную окраску к рецепторам эстрогенов альфа и/или прогестерону, и были негативны по отношению к рецепторам Her-2/neu.

Молекулярный подтип опухоли определен у 58 больных: люминальный подтип А наблюдался у 37 (63,8%) больных, люминальный подтип В – у 21 (36,2%).

В опухолевой ткани 56 больных выполнялась оценка экспрессии белка-регулятора клеточного цикла циклина D1, рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) и рецептора к трансформирующему фактору роста β.

Таблица 1 – Распределение больных в исследуемых группах в зависимости от распространенности процесса и объема проведенного специализированного лечения

Критерий распределения	Количество больных, абс. ч. (%)		Достоверность различий
	I группа (нет прогрессирования), n=60	II группа (прогрессирование), n=37	
В зависимости от распространенности процесса			
I стадия (T1N0M0)	24 (40)	11 (29,7)	p = 0,48
IIA стадия (T2N0M0, T0-1N1M0)	31 (51,7)	16 (43,3)	p = 0,63
IIIB стадия (T2N1M0)	5 (8,3)	10 (27)	p = 0,07
В зависимости от вида оперативного вмешательства			
Органосохраняющее оперативное лечение	34 (56,6)	17 (45,9)	p = 0,78
Радикальная мастэктомия	26 (43,4)	20 (54,1)	p = 0,54
В зависимости от объема системного лечения			
Адьювантная химиотерапия (FAC)	19 (31,6)	13 (35,1)	p = 0,97

В образцах опухоли 48 пациенток оценено наличие полиморфизма ESR1 +30T>C (rs2077647) в 1-м экзоне. Наличие полиморфных вариантов в 8-м экзоне ESR1 2014G>A (rs2228480) изучено у 49 больных.

Методы исследования

При определении рецепторного статуса использовали следующие антитела: к рецептору эстрогена ER α (клон 1D5, RTU, мышинные, Dako), к рецепторам прогестерона (клон PgR636, RTU, мышинные, Dako). Оценка рецепторного статуса проводилась количественным методом по шкале гистосчета (Histo-Score). При этом определялась степень экспрессии (процент позитивных клеток) и ее интенсивность (показатель экспрессии в баллах). Экспрессия рецепторов к эстрогену оценивалась по трехбалльной шкале (слабая, умеренная и выраженная экспрессия). Показатель экспрессии определялся как сумма произведений степени экспрессии на процент соответственно окрашенных клеток:

$$ПЭ = 3 \times A + 2 \times B + 1 \times C,$$

где A — процент клеточных ядер, имеющих выраженную окраску;

B — процент умеренно окрашенных ядер;

C — процент слабо окрашенных ядер.

Наряду со стандартным определением экспрессии рецепторов половых гормонов дополнительно оценивался характер распределения рецепторов в опухолевых элементах рака молочной железы по ранее запатентованному способу (патент РФ на изобретение № 2300111 от 27.05.2007 г.).

Если в опухоли отмечалось равномерное распределение рецепторов, независимо от интенсивности окрашивания экспрессию оценивали как гомогенную (рисунок 1,*а*). В тех случаях, когда наблюдались участки с позитивной и негативной экспрессией, а также с различной степенью ее выраженности, экспрессию рассматривали как гетерогенную (рисунок 1,*б*).

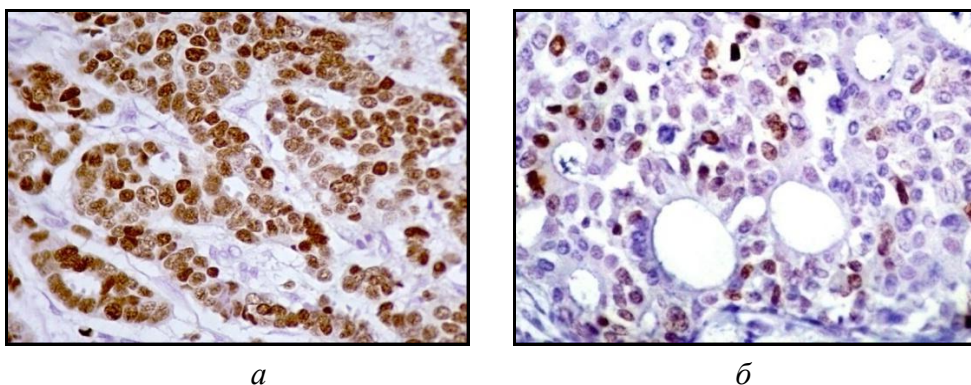


Рисунок 1 – Распределение рецепторов эстрогенов альфа в инвазивной карциноме неспецифического типа: *а* – гомогенный характер; *б* – гетерогенный характер. ИГХ-реакция. Окраска диаминобензидином и гематоксилином (ув. $\times 400$)

Определение Her-2/neu-статуса выполняли с использованием антител к онкопротеину с-erbB-2 (поликлональное, рабочее разведение 1:500, кроличьи).

Принадлежность опухоли к люминальному типу А или В определялась на основании оценки уровня пролиферативной активности по ядерному окрашиванию маркера Ki-67 (клон MIB-1, мышиные, RTU). Люминальный тип А РМЖ устанавливался при Ki-67 < 20%, люминальный тип В – при высокой пролиферативной активности (Ki-67 $\geq 20\%$).

Экспрессия рецепторов к белку-регулятору клеточного цикла циклину D1 оценивалась с использованием антител фирмы Dako, клон EP12. Анализ экспрессии в клетках опухоли проводили на основании положительного ядерного окрашивания.

При изучении экспрессии рецепторов к факторам роста использовали следующие антитела: к эпидермальному фактору роста 1 – EGFR – клон SP9, кроличьи, DBS; к рецептору трансформирующего фактора роста бета TGF- β R – клон 8A11, мышиные, Novocastra. При оценке экспрессии учитывалось позитивное мембранное и цитоплазматическое окрашивание.

Экспрессию рецепторов к факторам роста и циклину D1 оценивали в процентном соотношении положительно окрашенных клеток. В каждом исследованном случае учитывалась степень окрашивания по трехбалльной шкале (слабая, умеренная и выраженная экспрессия).

Молекулярно-генетические методы исследования

Изучение полиморфных вариантов в 1-м экзоне (rs2077647, ESR1 +30T>C) и 8-м экзоне (rs2228480, ESR12014G>A) гена рецептора эстрогенов альфа проведено с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Выделяли ДНК из опухолевых образцов путем депарафинизации срезов с помощью наборов Qiaamp DNA FFPE tissuekit (Qiagen). Качественная и количественная оценка ДНК проведена на спектрофотометре NanoDrop-1000 (NanoDrop, США). 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 дезоксирибонуклеотидтрифосфата; 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 состояла из предварительной денатурации при 95 °C в течение 2 мин с последующими 40 циклами денатурации при 95 °C (10 с), отжига при специфической температуре для каждой пары праймеров (30 с) на амплификаторе ICycler IQ5 (Bio-Rad, США).

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

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 8. Обсуждались результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией различий при $p < 0,1$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Отдаленные результаты комбинированного лечения больных люминальным раком молочной железы в зависимости от основных клинико-морфологических параметров

Изучалась связь отдаленных результатов лечения с возрастом пациенток. В группе больных без признаков прогрессирования заболевания средний возраст составил (55,5±1,1) года, с прогрессированием – (53,4±1,3) года. Выявлено отсутствие ассоциации данного критерия с исходом заболевания ($p=0,26$).

При оценке состояния менструальной функции установлено, что в целом преобладали пациентки, находящиеся в менопаузе: в группе без признаков прогрессии 33 (61,7%) больных, с прогрессированием – 22 (59,5%). Для данного параметра также не выявлена связь с развитием отдаленных метастазов ($p = 0,67$).

Изучалась зависимость исхода заболевания от размера первичной опухоли. Более половины больных имели размер опухоли, не превышающий 2 см (T₁): в группе с благоприятным исходом заболевания он отмечен у 33 (55%) пациенток, а при прогрессировании заболевания – у 20 (54,1%). Полученные данные свидетельствуют о том, что размер первичного опухолевого очага не связан с исходом заболевания, а соответственно и с эффективностью антиэстрогенной терапии тамоксифеном ($p = 0,92$).

Значимые результаты получены при соотнесении поражения регионарных лимфатических узлов с эффективностью проводимой терапии (рисунок 2). Так, в группе с прогрессированием заболевания вовлеченность лимфатических узлов (N1) отмечена у 18 (48,7%) пациенток, тогда как при благоприятном исходе заболевания – у 14 (23,4%) ($p = 0,01$). Это согласуется с общеизвестным фактом о сопряженности поражения регионарных лимфатических узлов с неблагоприятным исходом заболевания.

Проводилось изучение связи степени злокачественности первичной опухоли с эффективностью терапии (таблица 2). Показано, что при благоприятном исходе заболевания на фоне эндокринотерапии тамоксифеном высокая степень дифференцировки (G1) первичной опухоли у пациенток люминальным РМЖ встречалась достоверно чаще ($p = 0,038$).

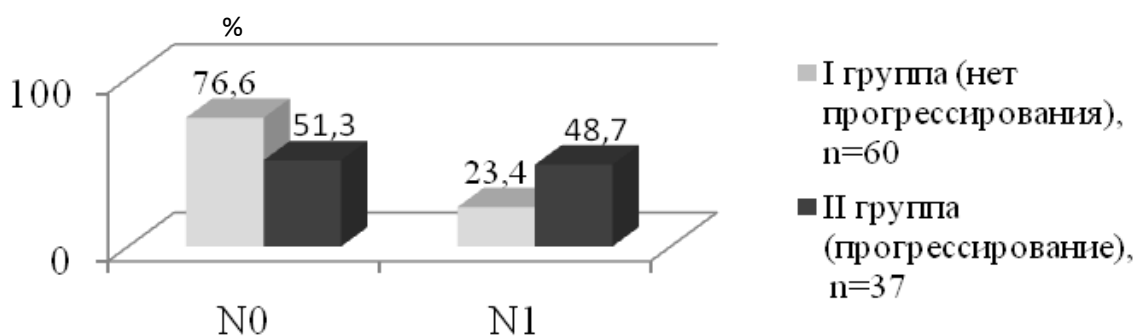


Рисунок 2 – Частота поражения регионарных лимфатических узлов у больных люминальным РМЖ в зависимости от исхода заболевания

Таблица 2 – Степень злокачественности опухоли в зависимости от исхода заболевания

Степень злокачественности опухолей (G)	Количество больных, абс. ч. (%)	
	I группа (нет прогрессирования), n=60	II группа (прогрессирование), n=37
Высокодифференцированные (G1)	29 (48,3)	10 (27)
Умеренно-дифференцированные (G2) + низкодифференцированные (G3)	31 (51,7)	27 (73)
p = 0,038		

В зависимости от молекулярного подтипа опухоли больные распределились в исследуемых группах равномерно – преобладал люминальный А тип РМЖ: при благоприятном исходе он диагностирован у 18 (56,3%) пациенток, а при прогрессировании заболевания – у 19 (73,1 %). Какой-либо значимой связи данного параметра с отдаленными результатами лечения отмечено не было (p = 0,29).

Особенности экспрессии ERα в ткани опухоли больных исследуемых групп

В качестве стандартных показателей рецепторного статуса рассматривались степень и интенсивность экспрессии рецепторов эстрогенов альфа. Отмечено, что высокие значения данных параметров ассоциированы с лучшим прогнозом, а соответственно и с эффективностью проводимой антиэстрогенной терапии тамоксифеном. Средние показатели степени и интенсивности экспрессии ERα в группе больных без признаков прогрессирования заболевания составили (75,5±0,3)% и (141,2±68,8)% соответственно, а в группе с прогрессированием – (69,0±0,3)% и (104,5±68,8)% (таблица 3).

Интересным оказался факт, что при гомогенном распределении средняя интенсивность экспрессии рецепторов эстрогенов альфа составила (208±10,6)%, тогда как при гетерогенном она была существенно ниже – (98,66±9,4)% (p=0,0003).

При оценке характера распределения рецепторов эстрогенов альфа в ткани опухоли в зависимости от исхода заболевания обнаружено, что в случае прогрессирования процесса гетерогенное распределение наблюдалось у 86,5%

больных, в то время как при благоприятном исходе данный показатель был значимо ниже и составил 58,3% ($p = 0,007$) (рисунок 3).

Таблица 3 – Степень и интенсивность экспрессии ER α в зависимости от исхода заболевания

Исследуемые показатели, M \pm S.D.	I группа (нет прогрессирования), n=60	II группа (прогрессирование), n=37	Достоверность различий
Степень экспрессии, %	75,5 \pm 0,3	69,0 \pm 0,3	$p = 0,007$
Интенсивность экспрессии, ед	141,2 \pm 68,8	104,5 \pm 68,8	$p = 0,008$

Полученные результаты позволяют полагать, что такой морфологический параметр, как характер распределения рецепторов эстрогенов альфа в ткани опухоли больных раком молочной железы, в значительной мере сопряжен с эффективностью гормонотерапии тамоксифеном.

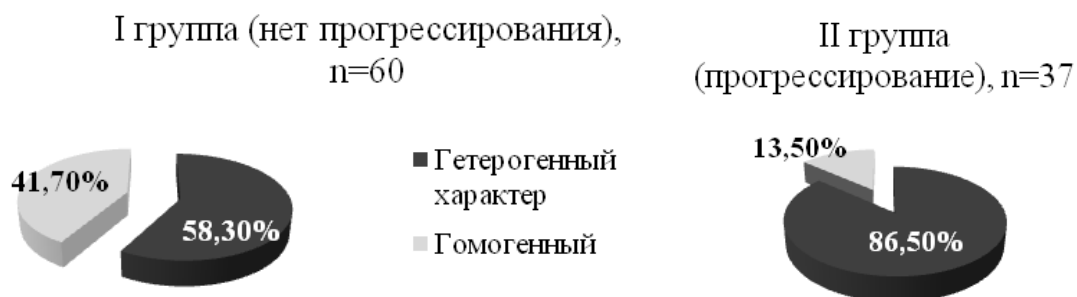


Рисунок 3 – Характер распределения ER α в зависимости от исхода заболевания

Учитывая высокую сопряженность уровня экспрессии ER α и характера их распределения в ткани опухоли с отдаленными результатами лечения, был проведен анализ совместного использования этих показателей. К условно благоприятным были отнесены опухоли, в которых степень экспрессии ER α составляла 70% и более и отмечался гомогенный характер их распределения, к неблагоприятным – в которых степень экспрессии менее 70% и гетерогенный характер распределения (таблица 4).

Таблица 4 – Проявление особенностей экспрессии ER α в зависимости от исхода заболевания

Характеристики опухолей	Количество больных, абс. ч. (%)	
	I группа (нет прогрессирования), n=45	II группа (прогрессирование), n=26
Благоприятные (высокая степень экспрессии, гомогенный тип распределения ER α)	25 (55,6)	5 (19,2)
Неблагоприятные (низкая степень экспрессии, гетерогенный тип распределения ER α)	20 (44,4)	21 (80,8)
$p = 0,006$		

Показано, что одновременное сочетание таких неблагоприятных характеристик опухоли, как низкая экспрессия ER α и их гетерогенное распределение, достоверно чаще встречается в группе пациенток с прогрессированием заболевания ($p = 0,006$).

Исследование экспрессии рецепторов факторов роста в ткани опухоли и их сопряженность с исходом заболевания

Для изучения возможной реализации неклассического геномного пути активации ER α и его влияния на исход заболевания была оценена взаимосвязь экспрессии рецепторов к факторам роста (EGFR, TGF- β) и белку-регулятору клеточного цикла циклина D1 с исходом заболевания.

Установлено, что сам факт наличия экспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста в ткани опухоли больных люминальным РМЖ устойчиво ассоциирован с неблагоприятным исходом заболевания на фоне антиэстрогенной терапии тамоксифеном ($p = 0,009$). При этом выявленная закономерность сохранялась при различных уровнях экспрессии EGFR (таблица 5).

Таблица 5 – Уровень экспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста в зависимости от исхода заболевания

Исследуемые группы	Качественный критерий EGFR		Уровень экспрессии					
	Негатив	Позитив	< 30%	$\geq 30\%$	<50%	$\geq 50\%$	<70%	$\geq 70\%$
I группа (нет прогрессирования), n=31	18	13	23	8	27	4	28	3
II группа (прогрессирование), n=25	5	20	10	15	14	11	15	10
Достоверность различий	$p = 0,009$		$p = 0,02$		$p = 0,02$		$p = 0,02$	

В отношении трансформирующего фактора роста бета и циклина D1 в ткани опухоли аналогичных закономерностей получено не было. Кроме того, отсутствовала какая-либо сопряженность между экспрессией рецепторов к EGFR, TGF- β , циклину D1, основными показателями рецепторного статуса и характером распределения ER α .

Изучение полиморфных вариантов гена ESR1, их связи с основными морфологическими параметрами и исходом заболевания

У 49 пациенток в образцах опухолевой ткани оценивалось распределение полиморфных вариантов гена ESR1 (rs2228480) в 8-м экзоне. Выявлено, что частота встречаемости мутантного аллеля составляет 19,4%.

При соотнесении частоты встречаемости полиморфных вариантов гена ESR1 с характером распределения рецепторов эстрогенов альфа установлено, что у больных, в опухолевых клетках которых определялась гомогенная окраска рецепторов, мутантный аллель отсутствовал, в то время как при гетерогенном распределении он встречался в 25,7% наблюдений ($p = 0,014$).

Анализ распределения аллелей гена ESR1 (rs2228480) у больных РМЖ был также соотнесен с исходом заболевания (рисунок 4). Оказалось, что в группе

пациенток с благоприятным исходом заболевания частота встречаемости мутантного аллеля А составила 9,3%, тогда как в ткани опухоли больных с прогрессированием заболевания она была значимо выше – 31,8% ($p = 0,01$). Можно полагать, что наличие точечных мутаций в 8-м экзоне гена ESR1 является одной из причин неэффективности антиэстрогенной терапии тамоксифеном.

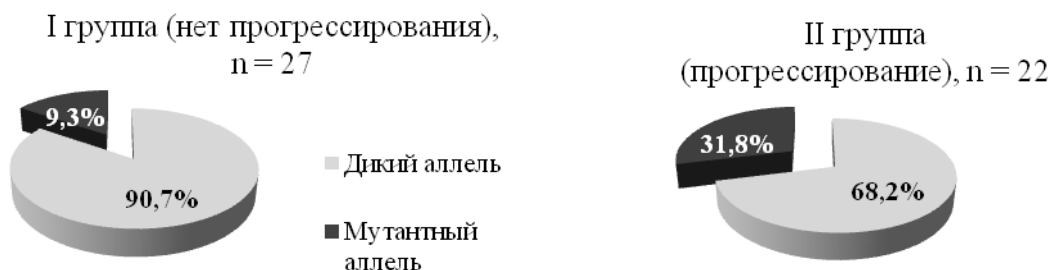


Рисунок 4 – Частота встречаемости аллелей гена ESR1 (rs2228480) у больных РМЖ в зависимости от исхода заболевания

При анализе связи частоты встречаемости аллелей гена ESR1 (rs2228480) с экспрессией рецепторов к изучаемым факторам роста (TGF- β , EGFR) и циклину D1 значимых результатов получено не было.

У 48 пациентов в образцах опухолевой ткани проводилось изучение полиморфных вариантов гена ESR1 (rs2077647) в 1-м экзоне, структурное расположение которого соответствует активационному центру AF-1, посредством которого возможна реализация неклассического геномного пути активации рецепторов. Частота мутации оказалась высокой и была отмечена в 71,4% случаев.

Нами проведен анализ с целью выявления взаимосвязи частоты полиморфных вариантов гена ESR1 (rs2077647) с экспрессией рецепторов к EGFR, TGF- β и циклину D1. Показано, что частота встречаемости дикого аллеля Т в 1-м экзоне гена ESR1 достоверно выше при высокой (более 30% положительно окрашенных клеток) экспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста ($p = 0,03$) (таблица 6). В отношении TGF- β и циклина D1 таких данных получено не было.

Таблица 6 – Частота встречаемости мутантного аллеля гена ESR1 (rs2077647) при различных уровнях экспрессии рецепторов к EGFR

Аллель гена ESR1	Качественный критерий EGFR		Уровень экспрессии					
	Негатив	Позитив	< 30%	$\geq 30\%$	<50%	$\geq 50\%$	<70%	$\geq 70\%$
Дикий аллель (Т)	15	22	18	19	23	14	24	13
Мутантный аллель (С)	25	34	42	17	49	10	52	7
Достоверность различий	$p = 0,97$		$p = 0,03$		$p = 0,02$		$p = 0,01$	

Математическая модель прогнозирования ожидаемой эффективности адъювантной терапии тамоксифеном

Для прогнозирования эффективности антиэстрогенной терапии тамоксифеном была построена математическая модель. В качестве независимых признаков выступали такие параметры, как состояние регионарных лимфатических узлов, степень экспрессии ER α и характер их распределения, полиморфизм 8-го экзона гена рецепторов эстрогенов альфа и экспрессия рецепторов к эпидермальному фактору роста 1.

Уравнение регрессии имеет вид

$$Y = -5,66 + 1,03X_1 + 0,38X_2 + 1,67X_3 + 1,21X_4 + 1,22X_5,$$

где Y – значение уравнения регрессии;

-5,66 – значение коэффициента регрессии свободного члена;

X₁ – состояние регионарных лимфатических узлов (0 – нет пораженных лимфоузлов, 1 – метастазы в лимфоузлах – N1), 1,03 – значение коэффициента регрессии признака;

X₂ – степень экспрессии ER α в ткани опухоли (0 – менее 70%, 1 – 70% и более), 0,38 – значение коэффициента регрессии признака;

X₃ – экспрессия рецепторов EGFR (0 – отрицательная экспрессия, 1 – положительная экспрессия), 1,67 – значение коэффициента регрессии признака;

X₄ – полиморфизм в 8-м экзоне гена ER α (1 – гомозигота по дикому аллелю, генотип GG, 2 – гетерозигота, генотип GA, 3 – гомозигота по мутантному аллелю, генотип AA), 1,21 – значение коэффициента регрессии этого признака;

X₅ – характер распределения клеток, экспрессирующих ER α в опухоли (1 – гомогенный, 2 – гетерогенный), 1,22 – значение коэффициента регрессии признака.

Вероятность прогрессирования заболевания на фоне проводимого лечения определяется по формуле

$$P = e^Y / (1 + e^Y),$$

где P – значение вероятности развития признака; e – математическая константа, равная 2,72.

В тех случаях, когда P > 0,5, следует ожидать высокую эффективность проводимого лечения, а при P < 0,5 – низкую эффективность антиэстрогенной терапии тамоксифеном и, как следствие, высокую вероятность прогрессирования заболевания. Чувствительность модели составила 85%, специфичность – 65%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что характер распределения рецепторов эстрогенов альфа, наличие точечных мутаций в 8-м экзоне гена ESR1 и экспрессию рецепторов к эпидермальному фактору роста в ткани опухоли больных люминальным раком молочной железы следует рассматривать в качестве дополнительных информативных маркеров, сопряженных с эффективностью антиэстрогенной терапии тамоксифеном. Выявление данных параметров в биопсийном или операционном опухолевом материале позволит более обоснованно подойти к выбору вида планируемой эндокринотерапии и тем самым персонализировать проводимое лечение.

ВЫВОДЫ

1. При неблагоприятном исходе заболевания достоверно чаще встречается поражение регионарных лимфатических узлов ($p = 0,01$), а также средняя и низкая степень дифференцировки (G2, G3) первичной опухоли ($p = 0,038$).

2. Средние показатели степени и интенсивности экспрессии ER α в группе без признаков прогрессирования составили $(75,4 \pm 0,2)\%$ и $(141,2 \pm 68,7)\%$ соответственно и были выше, чем в группе с прогрессированием заболевания, – $(68,9 \pm 0,3)\%$ и $(104,5 \pm 68,7)\%$. Различия оказались достоверно значимыми как для степени ($p = 0,007$), так и для интенсивности ($p = 0,008$) экспрессии ER α . Характер распределения рецепторов эстрогенов альфа можно рассматривать в качестве дополнительного информативного критерия эффективности эндокринотерапии. Так, при прогрессировании заболевания гетерогенное распределение ER α наблюдалось значительно чаще, чем при благоприятном исходе ($p = 0,007$).

3. Экспрессия рецепторов к эпидермальному фактору роста 1 в ткани опухоли молочной железы ассоциирована с неэффективностью проводимой терапии ($p = 0,009$). Данная закономерность проявляется при различном уровне экспрессии рецепторов EGFR. Не отмечена сопряженность экспрессии рецепторов к трансформирующему фактору роста бета и циклину D1 с появлением отдаленных метастазов.

4. Неблагоприятный исход заболевания связан с повышенной частотой встречаемости мутантного аллеля в 8-м экзоне гена рецепторов эстрогенов альфа ($p = 0,03$). У больных, в ткани опухоли которых выявлена данная мутация, достоверно чаще встречался гетерогенный характер распределения ER α ($p = 0,014$).

5. Разработанная модель логистической регрессии, включающая такие параметры, как состояние регионарных лимфатических узлов, степень экспрессии ER α и характер их распределения, а также полиморфизм 8-го экзона гена рецепторов эстрогенов альфа и экспрессия рецепторов к эпидермальному фактору роста 1, позволяет с чувствительностью 85% и специфичностью 65% прогнозировать ожидаемую эффективность антиэстрогенной терапии тамоксифеном.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. У больных люминальным раком молочной железы рекомендуется учитывать в качестве признаков, сопряженных с высоким риском прогрессирования заболевания на фоне проводимой антиэстрогенной терапии тамоксифеном, такие клинико-морфологические параметры, как поражение регионарных лимфатических узлов и степень злокачественности первичной опухоли.

2. Степень риска возврата заболевания на фоне проводимой терапии следует рассчитывать по формуле $Y = -5,66 + 1,03X_1 + 0,38X_2 + 1,67X_3 + 1,21X_4 + 1,22X_5$, где Y – значение уравнения регрессии; $-5,66$ – значение коэффициента регрессии свободного члена; X_1 – состояние регионарных лимфатических узлов, $1,03$ – значение коэффициента регрессии признака; X_2 – степень экспрессии рецепторов к эстрогенам альфа в ткани опухоли, $0,38$ – значение коэффициента регрессии признака; X_3 – экспрессия рецепторов EGFR, $1,67$ – значение коэффициента регрессии признака; X_4 – полиморфизм в 8-м экзоне гена ESR1, $1,21$ – значение коэффициента регрессии признака; X_5 – характер распределения клеток, экспрессирующих рецепторы к эстрогенам в опухоли, $1,22$ – значение коэффициента регрессии признака.

Вероятность прогрессирования заболевания на фоне проводимого лечения определяется по формуле $P = e^Y / (1 + e^Y)$, где P – значение вероятности развития признака; e – математическая константа, равная 2,72. При $P > 0,5$ определяют высокую эффективность терапии, а при $P < 0,5$ прогнозируют низкую эффективность терапии с большой вероятностью прогрессирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Паталяк С.В. Особенности морфологического строения люминального А типа рака молочной железы [Текст] / М.В. Завьялова, Н.С. Телегина, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер, Е.М. Слонимская, Е.В. Денисов, Н.В. Чердынцева // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 1 (55). – С. 38–41.

2. Паталяк С.В. Влияние степени гетерогенности рецепторного статуса и особенностей ультраструктуры рецепторов эстрогенов на эффективность гормонотерапии тамоксифеном у пациенток с люминальным раком молочной железы [Текст] // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – Приложение 1. – С. 71–72.

3. Паталяк С.В. Особенности лимфогенного метастазирования при люминальном А типе рака молочной железы [Текст] / М.В. Завьялова, Н.С. Телегина, С.В. Вторушин, В.М. Перельмутер, Е.М. Слонимская, Е.В. Денисов, Н.В. Чердынцева, Н.А. Скрябин, К.Ю. Христенко // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 2 (56). – С. 41–44.

4. Паталяк С.В. Влияние характера распределения рецепторов эстрогенов альфа и их индивидуальных генетических особенностей на эффективность эндокринотерапии тамоксифеном у пациенток с люминальным типом рака молочной железы [Текст] / Е.М. Слонимская, С.В. Вторушин, Н.Н. Бабышкина, В.М. Перельмутер, М.В. Завьялова, Л.А. Чурилова, С.Ю. Бахарев // Врач-аспирант. – 2014. – № 1.3 (62). – С. 423–427.

5. Паталяк С.В. Роль ростовых факторов в формировании резистентности к антиэстрогенной терапии тамоксифеном у пациенток с люминальным раком молочной железы [Текст] // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – Приложение 1. – С. 98.

6. Паталяк С.В. Роль морфологических и генетических особенностей строения рецепторов эстрогенов альфа в развитии резистентности к эндокринотерапии тамоксифеном у пациенток с люминальным раком молочной железы [Текст] / Е.М. Слонимская, С.В. Вторушин, Н.Н. Бабышкина // Сибирский онкологический журнал. – 2014. – № 3. – С. 39–44.

7. Patalyak S. Neoadjuvant chemotherapy for different molecular breast cancer subtypes: a retrospective study in Russian population / N. Babyshkina, E. Malinovskaya, S. Patalyak, O. Bragina, N. Tarabanovskaya, A. Doroshenko, E. Slonimskaya, V. Perelmuter, N. Cherdyntseva // Med. Oncol. – 2014. – Vol. 32, № 165. – P. 165–176.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИА – ингибиторы ароматазы
ЛГРГ – лютеинизирующий гонадотропин релизинг гормон
РМЖ – рак молочной железы
AF-1/2 – центры активации 1/2 рецепторов эстрогенов альфа
Akt – протеинкиназа В
EGFR – рецептор к эпидермальному фактору роста
ER α – рецепторы эстрогенов альфа
ESR1 – ген рецепторов эстрогенов альфа
Her-2/neu – эпидермальный фактор роста 2
mTOR – мишень иммунодепрессанта рапамицина, протеинкиназа серинтреониновой специфичности
M – среднее значение показателя
p – критерий значимости различий
PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа
PR – рецепторы прогестерона
S.D. – стандартное отклонение
SNP – однонуклеотидные полиморфизмы
TGF- β – трансформирующий фактор роста бета
 χ^2 – критерий согласия Пирсона