

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ В ПРЕОПЕРАЦИОННОМ ТЕСТЕ ИНГИБИТОРАМИ АРОМАТАЗЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

О. В. Бурменская [✉], Д. Ю. Трофимов, В. В. Кометова, М. В. Родионова, В. В. Родионов

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова, Москва, Россия

Тестовая предоперационная гормонотерапия стала стандартной процедурой лечения ESR+/Her2-негативного рака молочной железы ранних стадий. Хорошим подспорьем в оценке эффективности данной терапии могут стать транскрипционные профили генов. Целью исследования было оценить изменения экспрессионной активности генов при проведении предоперационного теста на гормоночувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы у женщин постменопаузального возраста при ESR+/HER2-негативном раке молочной железы. В исследование вошло 100 больных раком молочной железы, проходивших лечение в отделении патологии молочной железы ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова». Выполнено патоморфологическое исследование FFPE-блоков трепан-биопсии, проведенной до назначения теста на гормоночувствительность, и операционного материала, а также иммуногистохимическое (Ki67, ER, PR, HER2/neu) и молекулярно-генетическое исследование экспрессионной панели 45 целевых генов методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Применение ингибиторов ароматазы в предоперационном тесте на гормоночувствительность сопровождается статистически значимыми изменениями в экспрессии мРНК 37 генов в опухолях молочной железы, из них снижение уровня экспрессии установлено для 35 генов (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *BCL2*, *BAG1*, *PTEN*, *TYMS*, *EXO1*, *UBE2T*, *NAT1*, *SCGB2A2*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *CD274/PD-L1*), повышение для 2 генов (*SFRP1*, *KRT5*). Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем при разработке теста на гормоночувствительность и персонализации адъювантной системной терапии больных раком молочной железы.

Ключевые слова: ESR+/HER2-негативный рак молочной железы, экспрессия мРНК генов, ингибиторы ароматазы, летрозол, обратная транскрипция, количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, ОТ-кПЦР

Финансирование: работа выполнена при частичной финансовой поддержке научных исследований в рамках Государственного задания «Персонализации адъювантной терапии больных с люминальными Her2-негативными подтипами рака молочной железы с использованием предоперационного теста на гормоночувствительность» (номер государственного учета в системе ЕГИСУ НИОКТР – 124020600031-3).

Вклад авторов: В. В. Родионов — концепция и дизайн исследования; М. В. Родионова, В. В. Кометова — сбор и обработка материала; Д. Ю. Трофимов, О. В. Бурменская — организация и проведение ПЦР-исследования; О. В. Бурменская — анализ результатов, статистическая обработка данных, подготовка рукописи; В. В. Родионов, Д. Ю. Трофимов — редактирование.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НМИЦ АГП им. В. И. Кулакова» Минздрава РФ (протокол № 03 от 21 марта 2024 г.). Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Ольга Владимировна Бурменская
ул. Академика Опарина, д. 4, г. Москва, 117997, Россия; bourmenska@mail.ru

Статья получена: 08.11.2024 **Статья принята к печати:** 05.12.2024 **Опубликована онлайн:** 21.12.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.059

TRANSCRIPTION PROFILE IN PREOPERATIVE AROMATASE INHIBITOR RESPONSE TEST IN BREAST CANCER PATIENTS

Burmenskaya OV [✉], Trofimov DYu, Kometova VV, Rodionova MV, Rodionov VV

Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Today, preoperative hormone therapy is a standard procedure in the context of treatment of ESR+/HER2-negative early-stage breast cancer. Transcription profiles of genes helps make assessment of effectiveness of this therapy more accurate. This study aimed to investigate the changes in gene expression caused by the preoperative aromatase inhibitor response test in postmenopausal women with ESR+/HER2-negative breast cancer. The participants were 100 breast cancer patients treated at the Department of Breast Pathology of Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology. We did a pathomorphological study of FFPE blocks (trephine biopsied before the hormone response test was prescribed) and intraoperative samples, and immunohistochemical (Ki67, ER, PR, HER2/neu) and molecular genetic studies of 45 target genes (quantitative RT-PCR). Aromatase inhibitors in the preoperative hormone response test caused significant changes in the mRNA expression of 37 genes in breast tumors: for 35 of them (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *BCL2*, *BAG1*, *PTEN*, *TYMS*, *EXO1*, *UBE2T*, *NAT1*, *SCGB2A2*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *CD274/PD-L1*) the level was decreased, and for 2 genes it increased (*SFRP1*, *KRT5*). The results of this study can be used in the development of a hormone sensitivity test and personification of adjuvant systemic treatment for breast cancer patients.

Keywords: ESR+/Her2-negative breast cancer, mRNA gene expression, aromatase inhibitors, letrozole, real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-qPCR

Funding: the study was partially supported under the State Task "Personification of adjuvant treatment of patients with luminal HER2-negative subtypes of breast cancer enabled by a preoperative hormone sensitivity test" (state registry number in the Unified State R&D Efforts Registration System (EGISU NIOKTR): 124020600031-3).

Author contribution: VV Rodionov — study conceptualization and design; MV Rodionova, VV Kometova — material collection and processing; DYu Trofimov, OV Burmenskaya — PCR testing; OV Burmenskaya — analysis of the results, statistical processing of the data, manuscript authoring; VV Rodionov, DYu Trofimov — editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Committee on Biomedical Ethics of V.I. Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology (Minutes #03 of March 21, 2024). All patients signed an informed consent to participate in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Olga Vladimirovna Burmenskaya
Akademika Oparina, 4, Moscow, 117997, Russia; bourmenska@mail.ru

Received: 08.11.2024 **Accepted:** 05.12.2024 **Published online:** 21.12.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.059

Выделение пяти основных молекулярных подтипов опухолей молочной железы и дифференциальный подход к терапии больных раком молочной железы (PMЖ) стали настоящим прорывом в онкологии. Опухоли, экспрессирующие эстрогеновый (ESR) и прогестероновый (PGR) рецепторы, относятся к люминальным подтипам и, как правило, хорошо поддаются гормональной терапии.

У женщин в постменопаузе эстрогены образуются преимущественно при участии фермента ароматазы, который превращает синтезирующиеся в надпочечниках и жировой ткани андрогены (тестостерон и андростендион) в эстрадиол и эстрон. Поэтому для данной когорты пациенток при лечении опухолей молочной железы люминальных подтипов используют селективные ингибиторы ароматазы (летрозол, анастрозол). Ингибиторы ароматазы блокируют синтез эстрогенов путем высокоспецифичного конкурентного связывания с субъединицей ароматазы, кодируемой геном цитохрома P450 CYP19A1.

Экспрессирующие эстрогеновый рецептор опухоли доминируют в структуре молекулярных подтипов PMЖ [1, 2]. Однако даже внутри этой большой группы имеются существенные различия в особенностях течения заболевания и терапевтического ответа на гормонотерапию, что диктует необходимость изучения всех доступных биологических характеристик злокачественного новообразования для формирования оптимальной тактики лечения.

Одним из таких инструментов является предоперационный тест на гормоночувствительность. Смысл теста заключается в краткосрочном (2–4 недели) назначении гормональных препаратов на дооперационном этапе. Оценка динамики пролиферативной активности опухоли по изменению уровня Ki67 и экспрессии гормональных рецепторов позволяет спрогнозировать клинический ответ и оценить эффективность эндокринотерапии *in vivo*, и соответственно избавить часть пациентов от ненужной высокотоксичной химиотерапии. Рекомендация по проведению тестовой гормонотерапии включена в Консенсус ведущей Международной конференции по раннему раку молочной железы в Санкт-Галлене уже в 2021 г. и сохранилась в рекомендациях 2023 г. [3, 4], а также в отечественных рекомендациях по лечению рака молочной железы [5, 6].

Полезным инструментом в оценке эффективности проводимой терапии могут стать транскрипционные панели генов, задействованные в онкогенезе, разработанные специально для PMЖ, такие как Oncotype DX, PAM50, Mammaprint, и отечественные исследования [7, 8].

В связи с этим цель исследования состояла в оценке изменения экспрессионной активности генов при проведении предоперационного теста на гормоночувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы у женщин постменопаузального возраста при ESR+/HER2-негативном раке молочной железы.

Цель исследования состояла в оценке изменения экспрессионной активности генов при проведении предоперационного теста на гормоночувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы у женщин постменопаузального возраста при ESR+/HER2-негативном раке молочной железы.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В исследование включено 100 больных PMЖ, получивших лечение в отделении патологии молочной железы ФГБУ «НМИЦ АГП имени В. И. Кулакова в период с января 2019 г.

по август 2024 г. Для каждой пациентки исследован материал трепан-биопсии до проведения теста на гормоночувствительность и материал опухоли, полученный в результате хирургического вмешательства.

Критерии включения: инвазивный PMЖ, люминальный Her2-негативный подтип опухоли, постменопаузальный возраст, предоперационный тест на чувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы. Критерии исключения: неадекватное качество полученного материала трепан-биопсии для проведения молекулярно-генетических исследований.

В качестве теста на гормоночувствительность на дооперационном этапе пациенты в течение 2–4 недель принимали ингибиторы ароматазы — летрозол 2,5 мг или анастрозол 1 мг один раз в сутки.

Проведено гистологическое и иммуногистохимическое исследование биопсийного и операционного материала. Образцы отбирали в течение 30 мин после удаления опухоли и фиксировали в течение 48 ч в нейтральном забуференном формалине. После фиксации образцы помещали в автоматический микроволновой гистопроцессор LOGOS (Milestone, Италия) для ускоренной проводки тканей. Полученные срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Микроскопические препараты исследовали методом обзорной микроскопии, которую осуществляли на световом микроскопе Olympus BX46 (Olympus Corp., Япония). Иммуногистохимическую диагностику проводили на иммуногистостейнере BenchMark ULTRA (Ventana, Roche) с использованием антител к рецепторам эстрогенов (ER, клон SP1, VENTANA), прогестерона (PgR, клон 1E2, VENTANA), к Ki-67 (клон MIB-1, VENTANA), к онкопротеину гена эпидермального фактора роста 2 типа человека (c-erbB2).

При проведении молекулярно-генетических исследований использовали транскрипционную панель, включающую 45 целевых (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *GRB7*, *EGFR*, *FGFR4*, *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *MYC*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *SFRP1*, *TMEM45B*, *TMEM45A*, *TPX2*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *ANLN*, *BCL2*, *BAG1*, *PTEN*, *TYMS*, *EXO1*, *UBE2T*, *TPT1*, *SCGB2A2*, *KRT5*, *MIA*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *NAT1*, *CD68*, *TRAC*, *CD274/PD-L1*) и три референсных (*B2M*, *GUSB*, *HPRT1*) гена. Для проведения исследования парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм в количестве 2–3 штук помещали в сухие пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Подбор и подготовка материала осуществлялись врачом-патоморфологом с учетом результатов патоморфологического исследования.

Выделение тотальной РНК проводили после предварительной обработки образцов протеиназой К (набор реагентов «Проба-ПК»; «ДНК-Технология ТС», Россия), далее использовали набор реагентов для выделения нуклеиновых кислот на основе спиртового осаждения «Проба НК-плюс» («ДНК-Технология ТС», Россия). Полученные препараты РНК сразу использовали для постановки реакции обратной транскрипции со смесью олигонуклеотидов, специфичных для каждого гена. Реакцию обратной транскрипции проводили в течение 30 мин при температуре 40 °С с последующей инактивацией обратной транскриптазы в течение 10 мин при температуре 95 °С.

Транскрипционный профиль генов определяли методом мультиплексной ОТ-ПЦР «в реальном времени». Постановку ПЦР осуществляли с использованием детектирующих амплификаторов «ДТпрайм» («ДНК-Технология ТС», Россия) по программе 94 °С 5 мин; пять циклов 94 °С

Таблица 1. Патоморфологическая характеристика опухолей

Характеристика	Количество (%)
Размер опухолевого очага (pT)	
T1 (до 2 см): • T1a (> 0,1 см, но ≤0,5 см) • T1b (> 0,5 см, но ≤1 см) • T1c (> 1 см, но ≤ 2 см)	75 (75%)
	2 (2%)
	21 (21%)
	52 (52%)
T2 (> 2, но ≤ 5)	25 (25%)
Статус региональных лимфоузлов (pN)	
N0	76 (76%)
N1	17 (17%)
N2	4 (4%)
N3	3 (3%)
Гистологический вариант	
Инвазивный рак неспецифического типа	65 (65%)
Дольковый рак	23 (23%)
Особые варианты рака	12 (12%)
Степень злокачественности	
G1	18 (18%)
G2	74 (74%)
G3	8 (8%)

30 с — 64 °C 15 с; далее 45 циклов 94 °C 10 с — 64 °C 15 с и хранение.

В состав реакционных смесей входили олигонуклеотиды, специфичные в отношении мРНК, не амплифицирующие с матриц геномной ДНК, фланкирующие ампликоны размером до 100–120 п.н., что важно при работе с ДНК после фиксации в формалине. Детекцию продуктов амплификации осуществляли при температуре отжига праймеров за счет использования флуоресцентно-меченных TaqMan проб (Fam, Cy5).

По завершении амплификации уровень представленности транскриптов рассчитывали методом сравнения индикаторных циклов (метод ΔCt) с нормировкой относительно референсных генов *B2M*, *GUSB*, *HPRT1*. Данные представлены в относительных единицах (о.е.) в ln-шкале.

Для лучшего восприятия результатов исследования было рассчитано соотношение уровня экспрессии до терапии к уровню экспрессии после терапии (R) по формуле: $R = Eb/Ea$, где Eb — нормированный уровень экспрессии до терапии, Ea — нормированный уровень экспрессии после терапии. $R > 1$ расценивали как снижение экспрессии, $R < 1$ — как повышение экспрессии.

Статистические методы

Полученные результаты представлены в виде Me [1Q–3Q] (медиана, 1-й и 3-й квартили). При сравнении транскрипционных профилей генов до и после терапии ингибиторами ароматазы использовали T-критерий Уилкоксона для сравнения двух зависимых выборок. Критерий статистической значимости результатов принимали во внимание при значении $p < 0,01$. Расчет проводили с помощью программы статистической обработки результатов SPSS 17 (IBM, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование включено 100 пациенток РМЖ в возрасте 49–84 лет (63,3 [51–79]). Патоморфологическая характеристика опухолей представлена в табл. 1.

Размеры опухоли менее 2 см были зарегистрированы в 75% случаев. У 2/3 (76%) пациенток метастазы в региональные лимфатические узлы не были диагностированы. Во всех случаях заболевания отсутствовали отдаленные метастазы.

Среди гистологических вариантов преобладал неспецифический вариант — 65 (65%). В исследование включено 18% образцов с низкой степенью злокачественности (G1), 74% — с умеренной (G2) и 8% — с высокой степенью (G3).

При определении подтипа РМЖ методом ИГХ в 44 (44%) случаях был диагностирован люминальный А подтип и в 56 случаях (56%) — люминальный В Her2-негативный подтип опухоли.

После применения ингибиторов ароматазы в качестве предоперационного теста на гормоночувствительность в исследуемых образцах опухолей определены статистически значимые изменения в экспрессии мРНК 37 генов, из них снижение уровня экспрессии установлено для 35 генов (*ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *BCL2*, *BAG1*, *PTEN*, *TYMS*, *EXO1*, *UBE2T*, *NAT1*, *SCGB2A2*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *CD274/PD-L1*), повышение для двух генов *SFRP1* и *KRT5* (табл. 2).

На рисунке представлены результаты по пяти маркерам пролиферации, рецепторам эстрогена и прогестерона, уровень которых снизился после терапии.

Статистически значимое снижение экспрессии выявлено в группе маркеров пролиферации и регуляции клеточного

Таблица 2. Изменения в экспрессии мРНК маркеров после применения ингибиторов ароматазы

Маркер	Медиана уровня экспрессии, ln			Изменение уровня экспрессии, во сколько раз			
	до терапии	после терапии	p-уровень	Медиана	1-й квартиль	3-й квартиль	Доля образцов с изменением экспрессии*
Маркеры пролиферации и регуляции клеточного цикла (снижение экспрессии*)							
MKI67	-4	-5,4	7,27E-16	3,7	1,9	8,3	91%
MYBL2	-3,1	-4,9	5,17E-18	5,5	3	10,7	97%
AURKA	-4,7	-6,1	3,67E-17	3,9	2,4	6,1	96%
CCNB1	-3,3	-4,2	3,15E-14	2,1	1,5	3,9	90%
BIRC5	-5	-7	9,99E-16	8,8	3,5	16,6	90%
CCND1	-0,4	-1,3	3,11E-16	2,4	1,8	3,3	92%
CCNE1	-5	-6	2,92E-15	3	2	4	91%
CDKN2A	-2,4	-2,6	5,14E-06	1,2	0,9	1,7	70%
KIF14	-6,5	-8,1	1,19E-13	3,7	2,1	7,2	85%
PPP2R2A	-2,9	-3,4	2,56E-09	1,7	1,1	2,7	77%
PTTG1	-3,4	-4,6	8,12E-18	3,5	2,1	5,1	97%
TMEM45B	-2,9	-3,3	4,50E-05	1,4	0,9	2,4	67%
TMEM45A	-4,2	-4,2	0,036	-	-	-	-
TPX2	-3,2	-4,6	7,09E-17	4,8	2,7	8	96%
TPT1	-6	-6,2	0,269	-	-	-	-
ANLN	-4,1	-5,7	6,03E-17	4,5	3	7,5	97%
Миграция, инвазия, организация цитоскелета (снижение экспрессии)							
EMSY	-2,8	-3,4	1,99E-14	1,6	1,3	2,1	88%
PAK1	-2,4	-3	1,20E-16	1,8	1,5	2,4	93%
MMP11	-1,6	-3,1	8,58E-15	3,4	1,9	6,3	94%
CTSL2	-4,4	-5	2,32E-08	1,7	1,1	2,5	77%
Репликация и репарация ДНК (снижение экспрессии)							
EXO1	-5,4	-7,4	1,20E-17	6,4	3,1	15,3	
TYMS	-4,1	-5,2	5,18E-17	3	1,9	5	
Рецепторы гормонов (снижение экспрессии)							
ESR1	0,1	-0,7	6,11E-12	2,3	1,2	3,6	
PGR	-2,8	-4,7	1,90E-16	5,5	2,6	11,1	
AR	-1,9	-3	3,30E-16	3,4	2	5,7	
Супрессоры опухолей							
PTEN (снижение)	-2,1	-2,5	1,95E-09	1,4	1	2,1	
SFRP1 (повышение*)	-4	-3,5	0,007	1,4	0,6	4,1	
Апоптоз (снижение экспрессии)							
BCL2	-2,9	-3,5	5,09E-11	2	1,1	2,9	
BAG1	-2,9	-3,3	3,86E-15	1,6	1,2	2,2	
Рецепторы ростовых факторов (снижение экспрессии)							
GRB7	-2,2	-2,2	0,064	-	-	-	
FGFR4	-4,9	-5,5	2,18E-06	1,7	1	3,3	
ERBB2	-0,8	-1,2	2,55E-09	1,4	1	2,1	
EGFR	-3,7	-3,7	0,331	-	-	-	
Дифференцировка клеток							
KRT5 (повышение)	-5	-4,3	0,001	1,3	0,8	3,7	
SCGB2A2 (снижение)	-0,2	-1,2	0,002	2,2	0,5	6,1	
MIA	-6,1	-6,3	0,412	-	-	-	
Факторы транскрипции (снижение экспрессии)							
FOXA1	-0,7	-1,4	1,71E-13	1,9	1,5	2,7	
GATA3	-1,1	-1,9	1,65E-12	2,3	1,4	3,4	
ZNF703	-3,6	-5,3	8,43E-18	6,6	2,9	12,6	
MYC	-1,3	-1,2	0,029	-	-	-	
ДРУГОЕ (снижение)							
NAT1	-3,6	-4,7	1,93E-15	2,9	1,6	4,9	
UBE2T	-3,4	-4,9	1,03E-17	3,9	2,3	5,9	
Иммунитет							
CD274 (снижение)	-5,7	-5,9	0,003	1,3	0,8	1,9	
TRAC	-2,4	-2,3	0,386	-	-	-	
CD68	-2	-2	0,4	-	-	-	

Примечание: $R > 1$ — снижение экспрессии, $R < 1$ — повышение экспрессии.

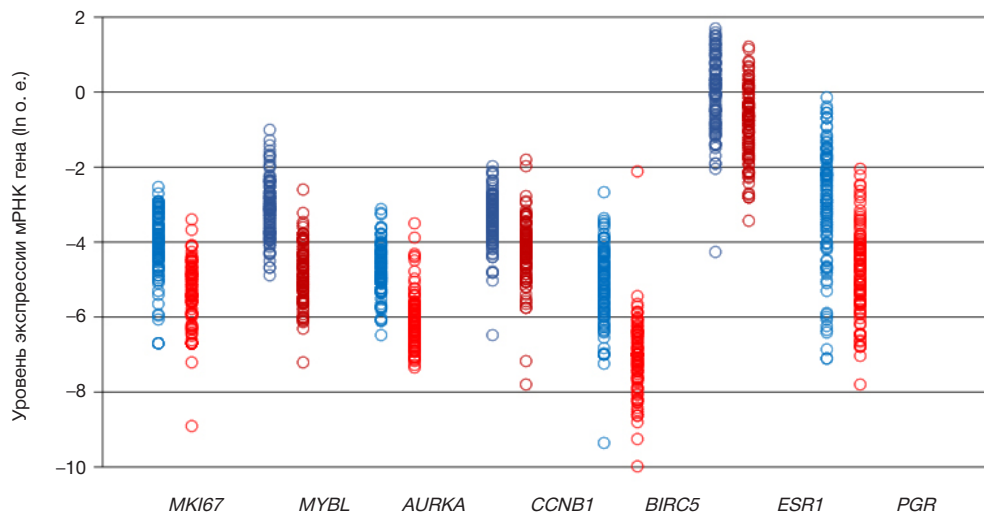


Рис. Изменение экспрессии мРНК генов пролиферации и гормональной рецепции при проведении теста на гормоночувствительность опухоли к ингибиторам ароматазы. Точками отмечены индивидуальные показатели уровня экспрессии мРНК гена в опухоли

цикла. Наиболее выраженные изменения отмечены для генов *MYBL2*, *AURKA*, *PTTG1*, *TPX2*, *ANLN*, для которых снижение экспрессии наблюдали у 96–97% женщин в среднем от 3,5 до 5,5 раз.

Статистически значимое снижение экспрессии наблюдали также:

- в группе маркеров миграции клеток и организации цитоскелета, наиболее выраженное снижение наблюдали для *MMP11* у 94% женщин в среднем 3,4 раза (интерквартильный размах 1,9–6,3);

- в группе маркеров репарации ДНК, наиболее выраженное снижение выявлено для *EXO1* у 96% женщин в среднем 6,4 раза (интерквартильный размах 3,1–15,3);

- в группе факторов транскрипции, наиболее выраженное снижение выявлено для *ZNF703* у 97% женщин в среднем 6,6 раза (интерквартильный размах 2,9–12,6);

- в группе гормональных рецепторов отмечено снижение уровня экспрессии мРНК гена *ESR1* у 84% женщин в среднем в 2,3 раза, однако наиболее выраженное снижение выявлено для генов *PGR* и *AR* более чем в 2 раза и более чем у 90% женщин;

- для несгруппированных маркеров гена убиквитинирования белков *UBE2T* и гена арилами-*N*-ацетилтрансферазы *NAT1* более чем у 90% женщин.

Чуть менее впечатляющее, но статистически значимое снижение экспрессии наблюдали для маркеров апоптоза (*BCL2*, *BAG*), рецепторов ростовых факторов (*FGFR4*, *ERBB2*), секреторного белка маммоглобин *SCGB2A2* и *PTEN*.

Статистически значимое повышение экспрессии отмечено для маркера дифференцировки эпителиальных клеток цитокератина *KRT5* и супрессора опухолей *SFRP1*: более чем у половины пациенток, в 67% и в 57% случаев соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Эстрогенпозитивные или люминальные опухоли молочной железы составляют до 70–75% всех случаев РМЖ [1, 2], а *ESR1*-зависимые сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, играют одну из ключевых ролей в опухолевой прогрессии.

Основу современных представлений о механизме действия стероидных гормонов заложила теория E. V. Jensen, предложившего модель действия гормона. В рамках этой модели молекула стероидного гормона, проникая внутрь клетки-мишени, связывается со специфическим рецептором,

затем образовавшийся гормон-рецепторный комплекс транслоцируется в клеточное ядро, где взаимодействует со специфическими последовательностями ДНК и изменяет экспрессию соответствующих генов [9].

Рецептор *ESR1* является фактором транскрипции, активируемым эстрогенами. Как фактор транскрипции, *ESR1* регулирует экспрессию генов, участвующих в клеточных циклах, пролиферации и апоптозе. Активация *ESR1* запускает экспрессию таких факторов, как *MYC*, *Cyclin D1*, *FOXM1*, *GREB1*, *BCL2* или амфирегулин, *IGF-1* и *CXCL12*, которые обладают онкогенным потенциалом, увеличивая пролиферацию раковых клеток [2]. Полагают, что лиганд-активированный *ESR1* связывается с эстроген-чувствительными элементами (ERE, estrogen responsive element) в промоторах целевых генов, также *ESR1* может взаимодействовать с факторами транскрипции, такими как активаторный белок 1 (AP1) и специфический белок 1 (SP1). Таким образом, это геномное действие регулирует транскрипцию сотен целевых генов, участвующих в росте и дифференцировке клеток [2, 10].

ESR1 также может быть встроен в цитоплазматическую мембрану клеток в специальном углублении (кавеоле) и взаимодействовать с G-белками, участвуя таким образом в продукции вторичных мессенджеров (цАМФ) и стимуляции различных сигнальных путей, например, *PI3K/AKT* или *Ras/MAPK*. Эта негеномная активность *ERα* в итоге приводит к активации факторов транскрипции, участвующих в регуляции пролиферации и выживания клеток [2, 10].

Поэтому не вызывает сомнения, что отсутствие или снижение количества лиганда *ESR1* (эстрогенов) при терапии ингибиторами ароматазы приводит к такому впечатляющему снижению экспрессии мРНК большого числа генов. Согласно полученным результатам, статистически значимое снижение экспрессии мРНК отмечено для факторов транскрипции *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, апоптоза *BCL2*, *BAG1*, пролиферации и регуляции клеточного цикла (*MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *ANLN*, *TPX2*). В условиях снижения пролиферативной активности также снижается экспрессия маркеров репликации и контроля репарации ДНК (*TYMS*, *EXO1*), маркеров организации цитоскелета и миграции клеток (*MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK*) и убиквитинирования белков *UBE2T*.

Интересно, что в другом исследовании при атипичной гиперплазии молочной железы наблюдалось повышение экспрессии мРНК генов, включенных в нашу панель, таких как *ESR1*, *AR*, рецептора эпидермального фактора роста *ERBB2*, транскрипционных факторов *FOXA1*, *GATA3*, *ZNF703*, а также снижение цитокератина *KRT5* и супрессора опухолей *SFRP1* [11]. Данные изменения авторы связали с активацией сигнальных путей, задействованных в онкогенезе.

В нашем исследовании после терапии ингибиторами ароматазы получены данные о снижении экспрессии мРНК генов *ESR1*, *AR*, *FOXA1*, *GATA3*, *ZNF703*, *ERBB2* и о повышении экспрессии мРНК генов *KRT5* и *SFRP1*, что может быть свидетельством позитивного влияния проводимой терапии на сигнальные пути, задействованные в онкогенезе.

Только для двух маркеров *KRT5* и *SFRP1* в нашем исследовании отмечено статистически значимое повышение экспрессии. Высокая экспрессия гена цитокератина *KRT5* характерна для базального эпителия молочной железы. Люминальный эпителий экспрессирует цитокератины *KRT8* и *KRT18* [2].

В настоящее время общепринято представление о том, что главным физиологическим регулятором экспрессии ядерных рецепторов в организме является концентрация циркулирующих стероидных гормонов. Эстрогены усиливают синтез собственных рецепторов, а также рецепторов прогестерона и рецепторов андрогенов [10]. Поэтому снижение экспрессии мРНК гена *ESR1*,

а также *PGR* и *AR* на фоне проводимой терапии было прогнозируемым. Нужно отметить, что при проведении исследования в первую очередь мы обратили внимание на снижение экспрессии прогестеронового рецептора, даже в большей степени, чем *ESR1*.

Экспрессию мРНК гена *PGR* напрямую регулирует активированный эстрогеновый рецептор. Некоторые авторы даже рассматривают *PGR* как индикатор функциональности *ESR1* [12]. Поэтому на фоне снижения эстрогенов и транскрипционной активности гена *ESR1* экспрессия мРНК гена *PGR* также снижается.

Выводы

Применение ингибиторов ароматазы в предоперационном тесте на гормоночувствительность сопровождается статистически значимыми изменениями в экспрессии мРНК 37 генов, из них снижение уровня экспрессии мРНК установлено для 35 генов (*MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *ESR1*, *PGR*, *AR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MMP11*, *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *BCL2*, *BAG1*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *TYMS*, *EXO1*, *PTEN*, *UBE2T*, *NAT1*, *SCGB2A2*, *CD274*), повышение для 2 генов (*KRT5* и *SFRP1*). Полученные результаты могут быть использованы при дальнейшей разработке способов оценки эффективности теста на гормоночувствительность и персонализации адъювантной системной терапии больных раком молочной железы.

Литература

1. Ahn SG, Nam SJ, Ahn SH, Jung Y, Park HK, Lee SJ, et al. Clinical Outcomes Following Letrozole Treatment according to Estrogen Receptor Expression in Postmenopausal Women: LETTER Study (KBCSG-006). *J Breast Cancer*. 2021; 24 (2): 164–74. DOI: 10.4048/jbc.2021.24.e17.
2. Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6834. DOI: 10.3390/ijms24076834.
3. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, et al. Clinical and genomic risk to guide the use of adjuvant therapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 2019; 380 (25): 2395–405. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904819>.
4. Burstein HJ, Curigiano G, Thürlimann B, et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol*. 2021; 32 (10): 1216–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.023>.
5. Золотой стандарт профилактики, диагностики, лечения и реабилитации больных РМЖ. Российское общество онкоммаммологов. 2024; 297 с.
6. Тюляндин С. А., Стенина М. Б., Фролова М. А. Практические инструменты, облегчающие выбор адъювантной лекарственной терапии у больных операбельным люминальным HER2-негативным раком молочной железы. Злокачественные опухоли. 2024; 14 (2): 51–57. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2024-003>.
7. Боженко В. К., Троценко И. Д., Кудинова Е. А., Варданян С. Г.,

- Захаренко М. В., Солодкий В. А., Макарова М. В. Возможности типирования рака молочной железы с использованием методики ОТ-ПЦР. *Сибирский онкологический журнал*. 2019; 18 (5): 61–67. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-61-67.
8. Бурменская О. В., Трофимов Д. Ю., Кометова В. В., Сергеев И. В., Маерле А. В., Родионов В. В., и др. Разработка и опыт использования транскрипционной сигнатуры генов в диагностике молекулярных подтипов рака молочной железы. *Акушерство и гинекология*. 2020; 2: 132–140. Доступно по ссылке: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.2.132-140>.
9. Красильников М. А., Щербаков А. М. Сигнальные пути, регулируемые эстрогенами, и их роль в опухолевой прогрессии: новые факты и направления поиска. *Успехи молекулярной онкологии*. 2014; 1: 18–26.
10. Довжикова И. В., Андриевская И. А. Рецепторы эстрогенов (обзор литературы). Часть 1. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2019; 72: 120–27. DOI: 10.12737/article_5d0ad2e5d54867.15780111.
11. Gregory KJ, Roberts AL, Conlon EM, Mayfield JA, Hagen MJ, Crisi GM, et al. Gene expression signature of atypical breast hyperplasia and regulation by SFRP1. *Breast Cancer Res*. 2019; 21 (1): 76. DOI: 10.1186/s13058-019-1157-5.
12. Kumar M, Salem K, Jeffery JJ, Yan Y, Mahajan AM, Fowler AM. Longitudinal Molecular Imaging of Progesterone Receptor Reveals Early Differential Response to Endocrine Therapy in Breast Cancer with an Activating ESR1 Mutation. *J Nucl Med*. 2021; 62 (4): 500–506. DOI: 10.2967/jnumed.120.249508. Epub 2020 Aug 28.

References

1. Ahn SG, Nam SJ, Ahn SH, Jung Y, Park HK, Lee SJ, et al. Clinical Outcomes Following Letrozole Treatment according to Estrogen Receptor Expression in Postmenopausal Women: LETTER Study (KBCSG-006). *J Breast Cancer*. 2021; 24 (2): 164–74. DOI:

- 10.4048/jbc.2021.24.e17.
2. Clusan L, Ferrière F, Flouriot G, Pakdel F. A Basic Review on Estrogen Receptor Signaling Pathways in Breast Cancer. *Int J Mol Sci*. 2023; 24 (7): 6834. DOI: 10.3390/ijms24076834.

3. Sparano JA, Gray RJ, Ravdin PM, et al. Clinical and genomic risk to guide the use of adjuvant therapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 2019; 380 (25): 2395–405. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1904819>.
4. Burstein HJ, Curigliano G, Thürlimann B, et al. Customizing local and systemic therapies for women with early breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for treatment of early breast cancer 2021. *Ann Oncol.* 2021; 32 (10): 1216–35. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.06.023>.
5. Zolotoj standart profilaktiki, diagnostiki, lechenija i rehabilitacii bol'nyh RMZh. Rossijskoe obshhestvo onkomammologov. 2024; 297 s. Russian.
6. Tjuljandin SA, Stenina MB, Frolova MA. Prakticheskie instrumenty, oblegchajushhie vybor ad#juvantnoj lekarstvennoj terapii u bol'nyh operabel'nym ljuminal'nym HER2-negativnym rakom molochnoj zhelezy. *Zlokachestvennye opuholi.* 2024; 14 (2): 51–57. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.18027/2224-5057-2024-003>. Russian.
7. Bozhenko VK, Trocenko ID, Kudinova EA, Vardanjan SG, Zaharenko MV, Solodkij VA, Makarova MV. Vozmozhnosti tipirovanija raka molochnoj zhelezy s ispol'zovaniem metodiki OT-PCR. *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2019; 18 (5): 61–67. DOI: 10.21294/1814-4861-2019-18-5-61-67. Russian.
8. Burmenskaya OV, Trofimov DYu, Kometova VV, Sergeev IV, Maerle AV, Rodionov VV, i dr. Razrabotka i opyt ispol'zovanija transkripcionnoj signatury genov v diagnostike molekuljarnyh podtipov raka molochnoj zhelezy. *Akusherstvo i ginekologija.* 2020; 2: 132–140. Dostupno po ssylke: <https://dx.doi.org/10.18565/aig.2020.2.132-140>. Russian.
9. Krasilnikov MA, Shherbakov AM. Signal'nye puti, reguliruemye jestrogenami, i ih rol' v opuholevoj progressii: novye fakty i napravlenija poiska. *Uspehi molekuljarnoj onkologii.* 2014; 1: 18–26. Russian.
10. Dovzhikova IV, Andrievskaja IA. Receptory jestrogenov (obzor literatury). *Chast' 1. Bjul'eten' fiziologii i patologii dyhanija.* 2019; 72: 120–27. DOI: 10.12737/article_5d0ad2e5d54867.15780111. Russian.
11. Gregory KJ, Roberts AL, Conlon EM, Mayfield JA, Hagen MJ, Crisi GM, et al. Gene expression signature of atypical breast hyperplasia and regulation by SFRP1. *Breast Cancer Res.* 2019; 21 (1): 76. DOI: 10.1186/s13058-019-1157-5.
12. Kumar M, Salem K, Jeffery JJ, Yan Y, Mahajan AM, Fowler AM. Longitudinal Molecular Imaging of Progesterone Receptor Reveals Early Differential Response to Endocrine Therapy in Breast Cancer with an Activating ESR1 Mutation. *J Nucl Med.* 2021; 62 (4): 500–506. DOI: 10.2967/jnumed.120.249508. Epub 2020 Aug 28.