



Шляхтунов Е.А.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь

Витебский областной клинический онкологический диспансер, Витебск, Беларусь

Экспрессия микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках при терапии трастузумабом пациентов, страдающих раком молочной железы с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu

Конфликт интересов: не заявлен.

Благодарности: работа выполнена в рамках задания ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» по теме «Изучить прогностическую и предиктивную значимость уровней экспрессии микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках в развитии химиорезистентности у пациентов, страдающих раком молочной железы с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2/neu», гос. регистрация № 20192590.

Подана: 13.10.2023

Принята: 30.11.2023

Контакты: evgenij-shlyakhtunov@yandex.ru

Резюме

Цель. Изучить экспрессию микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках как маркеров химиорезистентности у пациенток, страдающих раком молочной железы с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2-neu.

Материалы. Объектом исследования является периферическая кровь 40 пациентов (а именно циркулирующие опухолевые клетки), страдающих раком молочной железы с гиперэкспрессией HER2-neu. После выделения и лизирования ЦОК определяли экспрессию генов множественной лекарственной устойчивости ABC-транспортеров и спектра микроРНК в течение 12 месяцев терапии трастузумабом.

Результаты. Циркулирующие опухолевые клетки у пациентов, страдающих раком молочной железы, характеризуются генетической и фенотипической гетерогенностью, проявляющейся изменением уровня экспрессии микроРНК (miR-21, miR-155, miR-221, miR-210, miR-542-3p, miR-31, miR-17, let-7a, let-7c), онкогенов HER2-neu, BIRC5, а также генов химиорезистентности семейства ABC-транспортеров (ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCC10, ABCG2). Изменения экспрессии микроРНК в ЦОК выявлены в 94,0% случаев, при этом экспрессия онкосупрессорных микроРНК (miR-31, miR-17, let-7a, let-7c) характеризуется низким уровнем, онкогенных микроРНК (miR-21, miR-155, miR-221, miR-542-3p) – высоким ($p < 0,05$). Высокий уровень экспрессии онкогенных микроРНК miR-21 ($p = 0,006$), miR-155 ($p = 0,009$) и miR-542-3p ($p = 0,005$) в ЦОК коррелирует с HER2-neu-положительным РМЖ и худшим прогнозом. Сохранение в периферической крови ЦОК с высокой экспрессией онкогенных микроРНК статистически значимо увеличивает риск прогрессирования рака молочной железы на фоне терапии трастузумабом (ОР 18,33; 95% ДИ 2,672–125,810).



Заключение. Отсутствие эффекта от терапии трастузумабом может быть обусловлено у части пациентов развитием резистентности ЦОК к моноклональному анти-телу трастузумабу, что подтверждается сохранением и наличием в периферической крови ЦОК (в 37,5% случаев), в которых определяются высокие уровни экспрессии онкогенных микроРНК, главным образом miR-21 ($\geq 4,17$), miR-221 ($\geq 4,96$), miR-542-3p ($\geq 6,15$), с отсутствием или низким уровнем экспрессии онкосупрессорных микроРНК (miR-31, miR-17, let-7a, let-7c).

Ключевые слова: микроРНК, циркулирующие опухолевые клетки, рак молочной железы

Shliakhtunou Ya.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Vitebsk Regional Clinical Oncologic Dispensary, Vitebsk, Belarus

MicroRNA Expression in Circulating Cancer Cells During Treatment with Trastuzumab in Patients with Breast Cancer with Overexpression of the Epidermal Growth Factor Receptor HER2/neu

Conflict of interest: nothing to declare.

Gratitude: the work was performed within the framework of the government research programme "Basic and Applied Sciences – Medicine" on the topic "To study the prognostic and predictive significance of microRNA expression levels in circulating tumor cells in the development of chemoresistance in patients with breast cancer with overexpression of the epidermal growth factor receptor HER2/neu", state registration No. 20192590.

Submitted: 13.10.2023

Accepted: 30.11.2023

Contacts: evgenij-shlyakhtunov@yandex.ru

Abstract

Purpose. To study the expression of microRNAs in circulating tumor cells as markers of chemoresistance in patients suffering from breast cancer with overexpression of the epidermal growth factor receptor HER2-neu.

Materials. The peripheral blood of 40 patients (circulating tumor cells) suffering from breast cancer with overexpression of HER2-neu. After isolation and ligation of CCC, the expression of multidrug resistance genes of ABC transporters and the microRNA spectrum was determined during 12 months of trastuzumab therapy.

Results. Circulating tumor cells in patients with breast cancer are characterized by genetic and phenotypic heterogeneity, manifested by changes in the level of microRNA expression (miR-21, miR-155, miR-221, miR-210, miR-542-3p, miR-31, miR-17, let-7a, let-7c), oncogenes HER2-neu, BIRC5, as well as chemoresistance genes of the ABC transporter family (ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCC10, ABCG2). Changes in microRNA expression in the CCC were detected in 94.0% of cases, while the expression of oncosuppressive microRNAs (miR-31, miR-17, let-7a, let-7c) is characterized by a low level, oncogenic microRNAs (miR-21, miR-155, miR-221, miR-542-3p) is high ($p < 0.05$). The high level of expression of oncogenic miR-21 microRNAs ($p = 0.006$), miR-155 ($p = 0.009$) and miR-542-3p ($p = 0.005$)

in the CCC correlates with HER2-neu-positive breast cancer and a worse prognosis. Preservation of CCC in peripheral blood with high expression of oncogenic microRNAs significantly increases the risk of breast cancer progression during trastuzumab therapy (HR 18.33; 95% CI 2.672–125.810).

Conclusion. The lack of effect from trastuzumab therapy may be due to the development of CCC resistance to the monoclonal antibody trastuzumab in some patients, which is confirmed by the preservation and presence of CCC in peripheral blood (in 37.5% of cases), in which high levels of expression of oncogenic microRNAs are determined, mainly miR-21 (≥ 4.17), miR-221 (≥ 4.96), miR-542-3 ($p \geq 6.15$), with no or low expression of oncosuppressive microRNAs (miR-31, miR-17, let-7a, let-7c).

Keywords: microRNA, circulating tumor cells, breast cancer

■ ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на значительные успехи в диагностике и лечении пациентов, страдающих солидными опухолями, отдаленные метастазы остаются главной причиной смерти пациентов со злокачественными новообразованиями. У немалого количества пациенток (20–30%), страдающих раком молочной железы (РМЖ), после удаления первичной опухоли в течение последующих 5–10 лет развиваются отдаленные метастазы. Поздний метастатический рецидив обусловлен главным образом феноменом ранней диссеминации опухолевых клеток [1]. Минимальная остаточная болезнь (МОБ) определяется как присутствие опухолевых клеток в организме, в частности циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК), у онкологических пациентов после хирургического удаления первичной опухоли [2]. В 2007 г. ЦОК были впервые упомянуты в рекомендациях ASCO как потенциальные опухолевые маркеры для РМЖ.

С использованием различных модификаций молекулярно-генетических методов исследования возможно определение экспрессии опухоль-ассоциированных генов как в первичной опухоли, так и в ЦОК, а также идентификация свободно циркулирующей опухолевой ДНК в периферической крови. Ряд генов (BIRC5, Erb-B2/HER2-neu) могут рассматриваться в настоящее время как маркеры ЦОК, а соответственно МОБ [3], что порождает необходимость детальных исследований.

В последнее время явление РНК-интерференции все чаще оказывается в поле зрения ученых. Количество публикаций на ресурсе PubMed, содержащих ключевое слово RNA-interference, возросло с 2500 в 2002 г. до 6500 к 2015 г. Сегодня диагностическая, терапевтическая и прогностическая роли малых интерферирующих РНК изучаются во многих областях медицины. Особый интерес ученых всего мира вызывает роль микроРНК в процессах канцерогенеза, их диагностическая и прогностическая роль. В данном обзоре мы рассматриваем микроРНК в целях выявления их роли и расширения их потенциала как диагностических и прогностических биомаркеров при различных видах рака, в особенности HER2-позитивного рака молочной железы.

Иммунотерапия трастузумабом при HER2-позитивном раке молочной железы является современным стандартом лечения. Вместе с доказанной клинической эффективностью данного препарата при его применении особенно важно вовремя



определить наступление резистентности к нему. МикроРНК-сигнатуры могут использоваться для контроля наступления резистентности к проводимой терапии, а также как прогностические биомаркеры. В эксперименте Yang F. и соавт. были выявлены 4 микроРНК, имеющие отличную экспрессию у трастузумаб-чувствительных и трастузумаб-резистентных пациенток: miR-135b, miR-200b и miR-29a имели повышенную экспрессию, а miR-224 – пониженную экспрессию у пациенток с трастузумаб-резистентными опухолями [4].

Несмотря на увеличение количества исследований в данной области, микроРНК все еще остаются малоизученным классом биологически активных молекул. Они оказывают значительное влияние на регуляцию ключевых процессов в клетке, таких как деление, мезенхимально-эпителиальный переход, дедифференцировка. Эти процессы совместно и по отдельности определяют течение онкологического заболевания. Поэтому данные молекулы, доступные для изучения не только из биоптатов, но и в циркулирующих опухолевых клетках, а также в сыворотке крови, имеют большой потенциал как диагностические и прогностические биомаркеры, получаемые малоинвазивными методами.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Целью работы было изучить экспрессию микроРНК в циркулирующих опухолевых клетках как маркеров химиорезистентности у пациенток, страдающих раком молочной железы с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2-neu.

Исследование было организовано по принципу сплошного проспективного нерандомизированного исследования.

У пациентов с подтвержденным неметастатическим резектабельным РМЖ (I–IIA стадии) на следующий день после радикальной операции забирался образец периферической крови и исследовался на наличие ЦОК (мРНК HER2-neu+ / мРНК BIRC5+). После подтверждения гиперэкспрессии онкопротеина HER2-neu в опухолевой ткани (IHC/FISH), полученной в ходе радикальной операции, и при наличии ЦОК в образце крови, полученном после операции, пациенты включались в исследование. При местно-распространенном и метастатическом РМЖ (IIB–IV стадии) всем пациентам была проведена трепан-биопсия опухоли с оценкой молекулярно-биологического подтипа опухоли. После подтверждения гиперэкспрессии онкопротеина HER2-neu в опухолевой ткани (IHC/FISH) у них брали образец периферической крови и исследовали на наличие ЦОК (мРНК HER2-neu+ / мРНК BIRC5+). При наличии ЦОК пациентов включали в исследование. Таким образом была сформирована исследуемая группа из 40 ЦОК-положительных пациентов с I–IV стадиями РМЖ, получавших специальное лечение РМЖ в 2019–2020 гг. в УЗ «Витебский областной клинический онкологический диспансер».

Средний возраст пациентов составил $58,65 \pm 11,17$ года с индивидуальными колебаниями от 35 до 86 лет. Большинство опухолей встречалось категории pT1–pT2 (80,0%), с наличием регионарных метастазов pN+ – 75,0%, со средней и низкой степенью дифференцировки G2–G3 – 90,0%, в основном с лимфовенозной стромальной инвазией LVSI+ – 75,0%. Наиболее часто встречалась II стадия (IIA–IIB) – 60%, реже I стадия – 25,5%. У 12,5% обследованных диагностирована III стадия, а у 1 пациента (2,5%) – IV стадия опухолевого процесса. Преимущественно встречался

неспецифицированный протоковый рак – 77,5%. Одинаково часто определяли высокий и низкий индекс пролиферативной активности Ki 67.

Обогащение и выделение ЦОК проводили с использованием технологии экспресс-выделения опухолевых клеток из цельной крови на основе ковалентно связанных антител к CD326 на немагнитной полимерной матрице больших микросфер с последующим выделением ЦОК по размеру (S-pluriBead Maxi набор реагентов и антитела против CD326 S-pluriBead человека, Германия).

После выделения мРНК из лизированных обогащенных клеток, используя технологию обратной транскрипции, синтезировали кДНК, которую впоследствии использовали для анализа экспрессии генов в ПЦР в реальном времени с применением тест-систем производства ООО «Сивитал» (Беларусь). В качестве референсного гена использовали ген c-Abl. Для анализа экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости использовали специально подобранный набор праймеров и зондов Platinum PCR SuperMix (Invitrogen, США). Для анализа нормализованной экспрессии

Таблица 1
Кастомная панель для анализа микроРНК в ЦОК (QIAGEN, Германия)
Table 1
Custom panel for microRNA analysis in CCCs (QIAGEN, Germany)

МикроРНК	
Семейство	Тип
miR-221	Hsa-miR-221-5p
miR-21	Hsa-miR-21-5p
miR-210	Hsa-miR-210-5p
miR-542-3p	Mir-542-3p
miR-17	Hsa-miR-17-5p
miR-155	Hsa-miR-155-3p
miR-31	Hsa-miR-31-5p
let-7	Hsa-let-7a-5p Hsa-let-7c-5p

Таблица 2
Критерии оценки уровня экспрессии микроРНК в ткани рака молочной железы и ЦОК
Table 2
Criteria for assessing the level of microRNA expression in breast cancer tissue and CCCs

МикроРНК	Уровень экспрессии, отн. ед.		
	Низкий	Средний	Высокий
miR-155	<0,23	0,23–4,45	≥4,46
miR-21	<0,25	0,25–4,16	≥4,17
let-7a	<0,10	0,10–4,93	≥4,94
miR-210	<0,10	0,10–4,24	≥4,25
miR-31	<0,10	0,10–5,65	≥5,66
miR-17	<0,20	0,20–4,90	≥4,91
miR-221	<0,10	0,10–4,95	≥4,96
let-7c	<0,10	0,10–3,94	≥3,95
miR-542-3p	<0,16	0,16–6,14	≥6,15



были выбраны следующие гены: ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCC10 и ABCG2. Выделение микроРНК из лизированных, обогащенных клеток во втором из парных образцов (5 мл) выполняли в соответствии с инструкциями производителя для наборов для выделения miRNA (ReliaPrep™ miRNA Cell and Tissue Miniprep System, Promega, Z6211, Германия). Индивидуальная пользовательская панель (QIAGEN, Германия) использовалась для анализа уровня экспрессии микроРНК (табл. 1).

Определение экспрессии исследуемого спектра микроРНК проводили методом ПЦР в реальном времени. Уровень экспрессии микроРНК в ЦОК оценивали по отношению к уровню экспрессии этих параметров в нормальной ткани молочной железы. Малая ядерная РНК RNU1 использовалась в качестве референсного гена. Критерии оценки уровня экспрессии исследуемого спектра микроРНК представлены в табл. 2.

Статистическая обработка данных выполнялась с помощью программного обеспечения SPSS (версия 21, США), Statistica (версия 10, США) и включала проверку нормальности распределения количественных показателей в выборке с использованием критерия Shapiro – Wilk. Количественные значения показателей не подчинялись нормальному закону распределения и описывались в виде медианно-квартильных характеристик: медианы, 25-го (LQ) и 75-го квартилей (UQ). Сравнение категориальных переменных осуществлялось посредством критериев χ^2 и Fisher – Freeman – Halton. Для анализа взаимосвязи между номинальными переменными применялся коэффициент Крамера (v). Для выявления показателей, статистически значимо ассоциированных с риском неблагоприятного течения РМЖ, проведен однофакторный анализ. Рассчитаны показатели относительного риска (ОР) и его 95% доверительный интервал (ДИ). Во всех случаях различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ЦОК, экспрессирующие гены-маркеры HER2-neu, BIRC5 и c-Abl, были выделены и идентифицированы во всех 40 парных образцах периферической крови пациентов с гиперэкспрессирующим HER2-neu раком молочной железы до начала адъювантной терапии. Экспрессия гена HER2-neu определялась в 33 (82,5%) случаях. Несогласованность случаев по ИГХ первичной опухоли и ЦОК составила 17,5%.

Экспрессия гена антиапоптотического протеина BIRC5 определялась в 23 (57,5%) случаях. Экспрессия какого-либо из генов множественной лекарственной устойчивости определялась во всех 40 (100%) образцах.

По результатам проведенного молекулярно-генетического исследования изменения экспрессии микроРНК выявлены у 36 (94,0%) пациентов. Аберрантная экспрессия онкогенных микроРНК miR-21 выявлена у 22 (55,0%) пациентов, miR-210 – у 12 (30,0%), miR-155 – у 10 (25,0%), miR-542-3p – у 5 (12,5%), miR-221 – у 4 (10,0%). Изменения экспрессии miR-155, miR-21, miR-182 и 542-3p характеризовались высоким уровнем, miR-210 – низким ($p < 0,001$). Патологическая экспрессия онкосупрессорных микроРНК let-7c – в 7 (17,5%) случаях, miR-31 и miR-17 – в 7 (17,5%) и 8 (20%) соответственно, let-7a – в 4 (10,0%). Характер изменения экспрессии онкосупрессорных микроРНК в ЦОК соответствовал низкой экспрессии ($p < 0,05$).

Нормализованная экспрессия генов ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCC10 соответствовала преимущественно высокому уровню ($p < 0,05$), а гена ABCG2 – низкому ($p < 0,001$).

Сводные графические данные представлены на рис. 1.

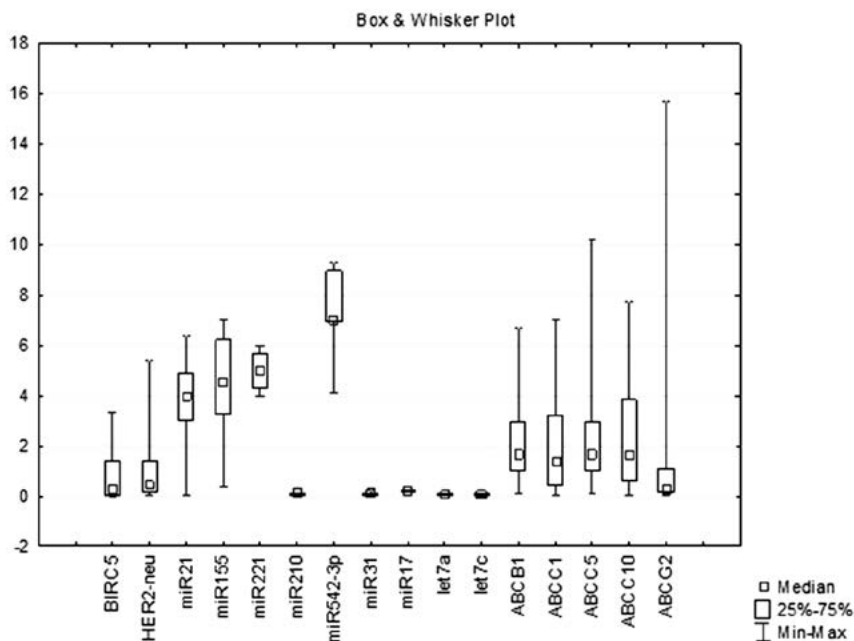


Рис. 1. Уровни нормализованной экспрессии генетических сигнатур ЦОК
Fig. 1. Normalized expression levels of CCCs genetic signatures

При анализе частоты встречаемости aberrантной экспрессии исследуемого спектра микроРНК в ЦОК и тканевых антигенов в первичной опухоли установлено, что высокий уровень экспрессии miR-21 ($\geq 4,17$ отн. ед.) ($p_{\chi^2}=0,006$) и miR-155 ($\geq 4,46$ отн. ед.) ($p_{\chi^2}=0,009$) преобладает при HER2-neu-положительном РМЖ и активно пролиферирующих опухолевых клетках молочной железы ($Ki-67 \geq 20\%$) ($p=0,025$), высокая экспрессия miR-221 ($\geq 4,96$ отн. ед.) – при дольковом гистологическом типе опухоли ($p=0,048$).

Зависимость уровня нормализованной экспрессии от размера первичной опухоли не установлена. В то же время уровень нормализованной экспрессии микроРНК miR-210 и let-7a достоверно средне коррелирует с метастатическим поражением лимфатических узлов. Так, отмечается высокий уровень экспрессии miR-210 при наличии пораженных лимфатических узлов ($R_s=0,31$ при $p<0,01$), а также низкие уровни let-7a ($R_s=0,37$ при $p<0,01$).

Статистически значимая корреляционная связь установлена между экспрессией miR-21 и генов HER-neu и BIRC5. Так, при высокой экспрессии miR-21 отмечается снижение экспрессии гена рецептора эпидермального фактора роста HER-neu ($R_s=-0,34$ при $p<0,01$) и повышение уровня экспрессии антиапоптотического протеина сурвивина, кодируемого геном BIRC5 ($R_s=0,7$ при $p<0,01$). Данный факт может свидетельствовать о наличии резистентности к моноклональному антителу трастузумабу ввиду возможного отсутствия мишени – самого рецептора эпидермального фактора роста на поверхности ЦОК.

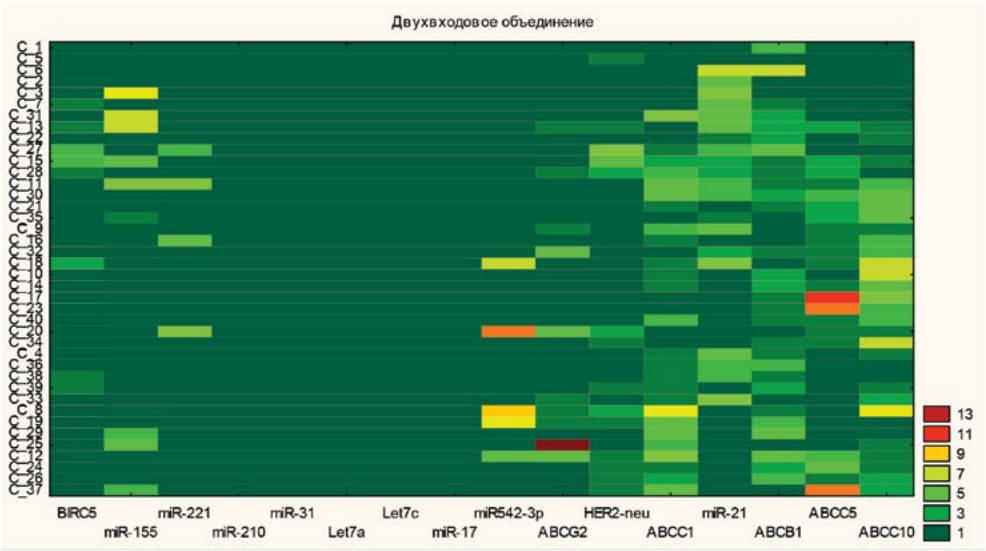


Рис. 2. Кластерный анализ: двухходовое объединение
Fig. 2. Cluster analysis two: input union

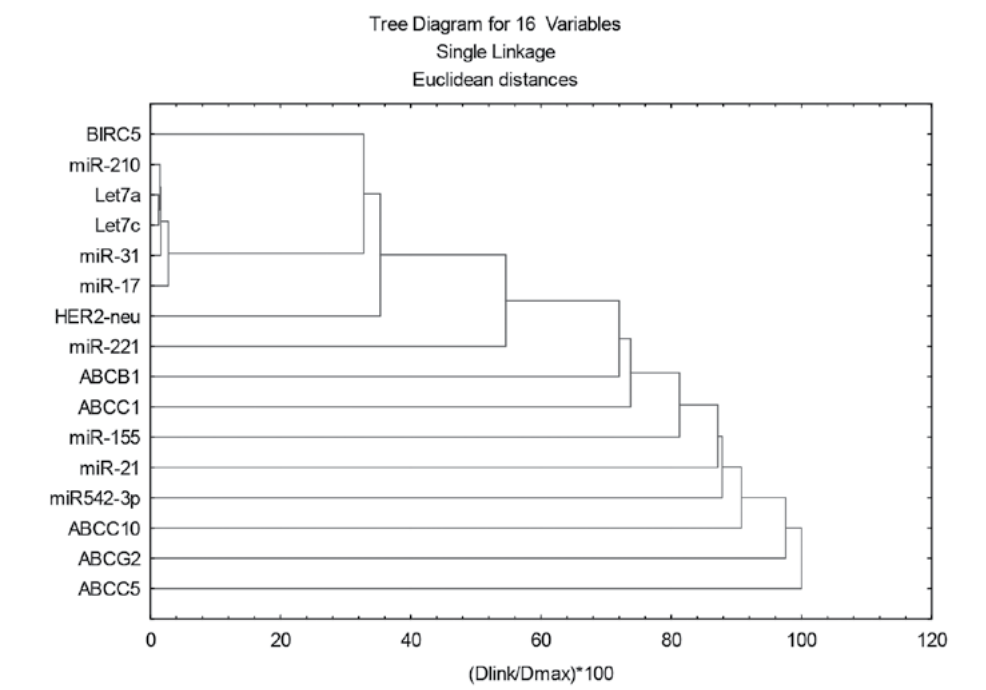


Рис. 3. Кластерный анализ: иерархическое дерево
Fig. 3. Cluster analysis: hierarchical tree

Кластерный анализ установил интересные закономерности в уровнях нормализованной экспрессии и наличия самой экспрессии онкогенов HER2-neu, BIRC5, онкогенных и онкосупрессорных микроРНК, а также генов химиорезистентности суперсемейства ABC-транспортёров в ЦОК.

На рис. 2, 3 обращает на себя внимание содружественная высокая экспрессия генов ABC-транспортёров и микроРНК miR-21, что может свидетельствовать о химиорезистентных к антрациклинам, таксанам и трастузумабу клонов. В то же время существует содружественная экспрессия умеренного уровня HER2-neu и miR-542-3p низкого уровня miR-17, что может говорить о чувствительных к трастузумабу клонов.

Определяется кластеризация клонов с экспрессией антиапоптотического протеина BIRC5 и онкогенных miR-121 и miR-155.

Терапия трастузумабом проводилась в течение 12 месяцев с момента установления показаний для ее назначения. Мониторинг ЦОК и анализ экспрессии микроРНК в них проводились на сроках 3, 6, 9, 12 месяцев.

Как уже отмечалось, на момент начала терапии у 40 пациентов ЦОК были идентифицированы во всех образцах. Через 3 месяца лечения таргетные ЦОК определялись в образцах периферической крови 24 пациентов (60,0%). Данная тенденция сохранилась к 6 месяцам приема трастузумаба, у этих же 24 женщин имело место сохранение ЦОК. К 9 месяцам терапии таргетные ЦОК сохранились у 20 пациентов (50,0%). К 12 месяцам 18 человек (45,0%) имели в периферической крови опухолевые клетки, экспрессирующие гены BIRC5 и/или HER2-neu.

При анализе экспрессии микроРНК в ЦОК, сохраняющихся в периферической крови на фоне терапии трастузумабом, были получены следующие данные. Качественный и количественный показатели экспрессии микроРНК в ЦОК характеризуются выраженным разнообразием в каждом конкретном клиническом случае. Однако имеет место определенная тенденция. Так, онкогенная miR-21 экспрессируется наиболее часто на всех этапах исследования, точно так же как и miR-542-3p. По мере проведения терапии трастузумабом отмечается рост частоты экспрессии онкосупрессорных микроРНК miR-17 и miR-31 (рис. 4).

На рис. 5 следует обратить внимание на кардинальные изменения в медианном уровне относительной экспрессии микроРНК и генов BIRC5 и HER2-neu в ЦОК с течением времени на фоне терапии трастузумабом. Имеет место увеличение уровня экспрессии гена BIRC5 и значительное снижение уровня экспрессии гена HER2-neu в ЦОК начиная с 6-го месяца терапии. Также начиная с 6-го месяца таргетного лечения отмечается изменение профиля уровней экспрессии микроРНК. На фоне сохранения высоких уровней экспрессии miR-21, miR-155 после 3 месяцев снижения уровня miR-542-3p отмечается его рост после 6 месяцев до высокого уровня. При этом к 12-му месяцу отмечается рост уровней онкосупрессорных микроРНК miR-31 и miR-17 на фоне стабильно низкого уровня let-7a и let-7c.

На фоне сохранения высоких максимальных уровней экспрессии miR-21, miR-155 после 3 месяцев незначительного снижения уровня miR-542-3p отмечается его рост после 6 месяцев до значительных уровней. Данный факт может свидетельствовать о развитии резистентности к трастузумабу. При этом к 12-му месяцу отмечается рост максимальных уровней онкосупрессорных микроРНК miR-31 и miR-17, что, в свою очередь, может говорить о попытке опухолевых клеток «восстановить» чувствительность к таргетному агенту. Однако стабильно низкие уровни экспрессии таргетного

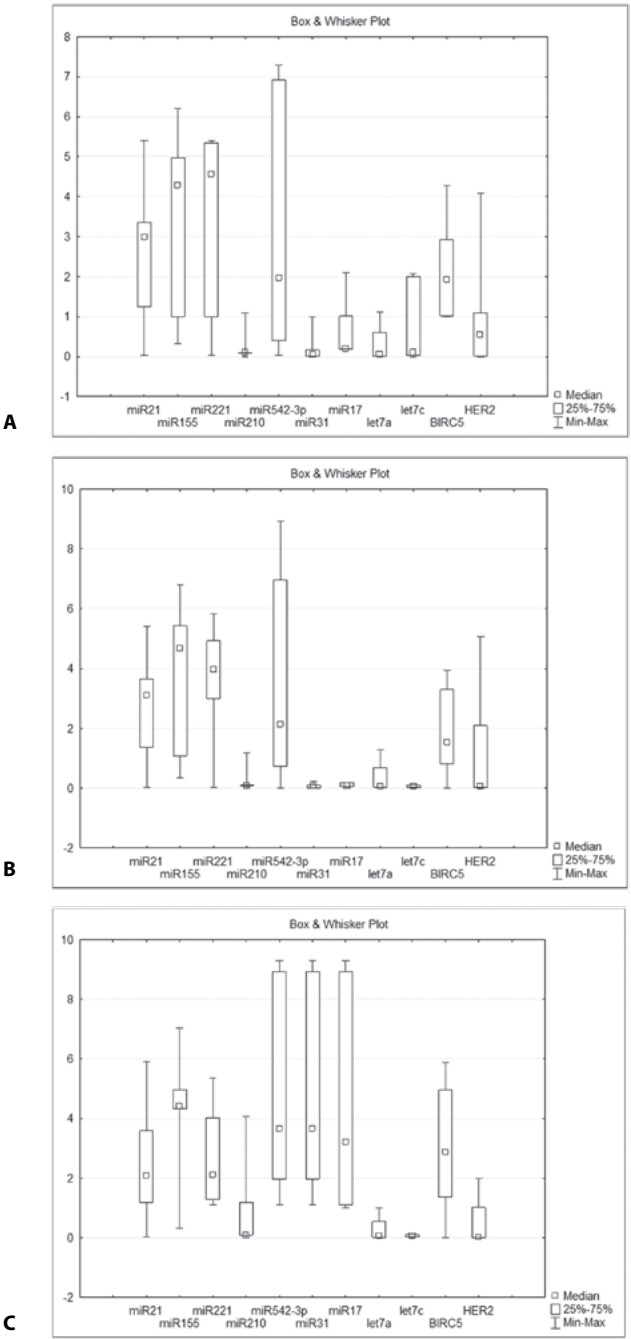


Рис. 4. Показатели экспрессии генетических сигнатур в ЦОК после 3 (А), 6 (В), 12 (С) месяцев терапии трастузумабом
Fig. 4. Indicators of expression of genetic signatures in CCCs after 3 (A), 6 (B), 12 (C) months of trastuzumab therapy

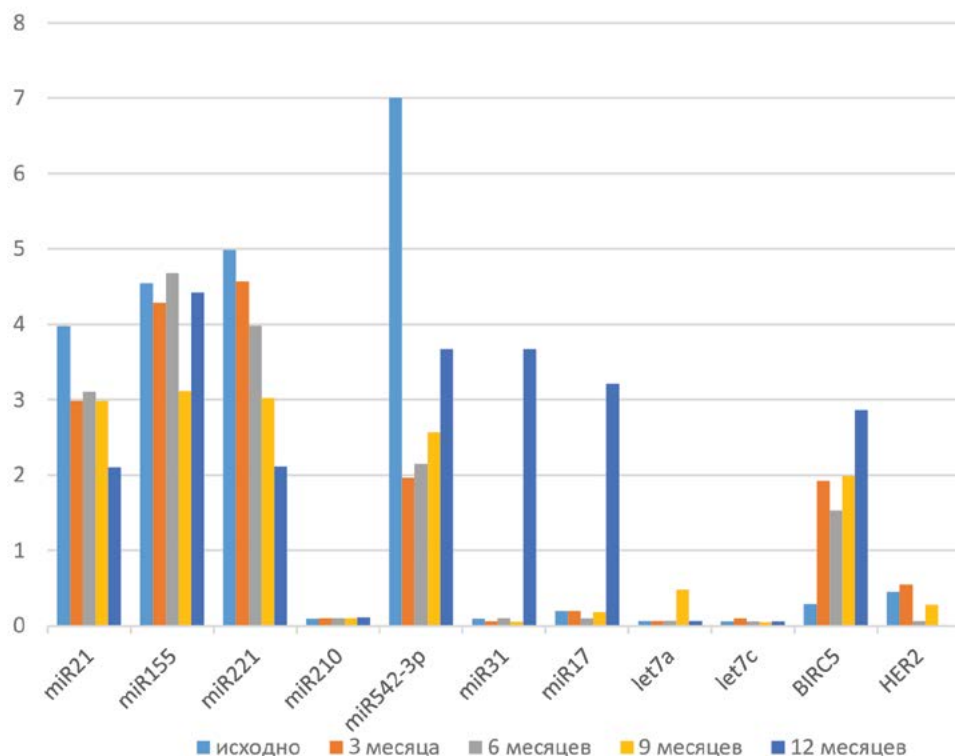


Рис. 5. Графическое изображение динамики медианного уровня нормализованной экспрессии генетических сигнатур, определяемых в ЦОК, при терапии трастузумабом в течение 12 месяцев пациентов с РМЖ

Fig. 5. Graphical representation of the dynamics of the median level of normalized expression of genetic signatures determined in CCCs during trastuzumab therapy for 12 months in patients with breast cancer

гена HER2-neu, обеспечивающего трансляцию и синтез мишени для трастузумаба, свидетельствуют об отсутствии этой мишени. При этом экспрессия (уровень экспрессии) антиапоптотического гена BIRC5 к году терапии значительно возрастает, что свидетельствует о развивающейся резистентности к другим противоопухолевым агентам, в частности к таксанам. Данная тенденция прослеживается и при анализе минимальных уровней нормализованной экспрессии.

Терапия трастузумабом пациентов, страдающих РМЖ с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста HER2-neu, продолжалась в течение 12 месяцев. Как уже отмечалось, к 12 месяцам лечения ЦОК идентифицировались у 18 из 40 профильных пациентов. К году наблюдения прогрессирование (возврат болезни) было диагностировано с использованием методов визуализации (УЗИ, рентгенография, КТ, МРТ) у 15 пациентов. Следует отметить, что у всех 15 пациентов с прогрессированием заболевания имело место сохранение ЦОК. Следует обратить внимание, что в данных случаях имело место определение высоких уровней нормализованной экспрессии онкогенных микроРНК на фоне низких уровней онкосупрессорных



микроРНК со снижением уровня экспрессии гена HER2-neu и роста уровня экспрессии гена BIRC5.

При расчете и анализе относительных рисков возврата болезни было установлено, что сохранение в периферической крови ЦОК с высокими уровнями относительной экспрессии онкогенных микроРНК (miR-21, miR-155, miR-542-3p) при снижении относительного уровня экспрессии гена HER2-neu статистически значимо увеличивает риск возврата заболевания на фоне приема трастузумаба более чем в 18 раз. Сводные данные относительных рисков и шансов представлены в табл. 3.

Таким образом, впервые установлено, что у части пациентов имеет место развитие резистентности к моноклональному антителу трастузумабу, что подтверждается сохранением и наличием в периферической крови ЦОК (в 37,5% случаев), в которых определяются высокие уровни экспрессии онкогенных микроРНК, главным образом miR-21 ($\geq 4,17$), miR-221 ($\geq 4,96$), miR-542-3p ($\geq 6,15$), с отсутствием или низким уровнем экспрессии онкосупрессорных микроРНК (miR-31, miR-17, let-7a, let-7c). Также в данных ЦОК определяется высокий уровень экспрессии гена антиапоптотического протеина сурвивина BIRC5 и резкое снижение экспрессии гена рецептора эпидермального фактора роста HER2-neu, что, возможно, обусловлено влиянием онкогенных микроРНК. Сохранение в периферической крови ЦОК с высокой экспрессией онкогенных микроРНК статистически значимо увеличивает риск прогрессирования рака молочной железы на фоне терапии трастузумабом (ОР 18,33; 95% ДИ 2,672–125,810).

Ввиду особой актуальности проблемы роста заболеваемости раком молочной железы все больше ученых исследуют возможности микроРНК для ранней диагностики, контроля хода лечения и прогнозирования выживаемости пациентов с данной патологией. Так, уровни экспрессии miR-21 и miR-210 при раке молочной железы могут обладать прогностической ценностью. В одной из работ были получены образцы опухолевой ткани и прилежащей неизмененной ткани 68 пациенток с РМЖ

Таблица 3

Показатели относительного риска прогрессирования РМЖ на фоне терапии трастузумабом при сохранении ЦОК с высокими уровнями экспрессии онкогенных микроРНК miR-21, miR-155, miR-542-3p

Table 3

Indicators of the relative risk of breast cancer progression during trastuzumab therapy while maintaining CCCs with high levels of expression of oncogenic microRNAs miR-21, miR-155, miR-542-3p

Абсолютный риск в основной группе (EER)	0,833
Абсолютный риск в контрольной группе (CER)	0,045
Относительный риск (RR)	18,333
Стандартная ошибка относительного риска (S)	0,983
Нижняя граница 95% ДИ (CI)	2,672
Верхняя граница 95% ДИ (CI)	125,810
Снижение относительного риска (RRR)	17,333
Разность рисков (RD)	0,788
Число пациентов, которых необходимо лечить (NNT)	1,269
Чувствительность (Se)	0,938
Специфичность (Sp)	0,875

разных клинических стадий, получавших хирургическое лечение без предварительной радиотерапии или химиотерапии. В результате экспрессия miR-21 и miR-210 в опухолевой ткани была значительно выше, чем в прилежащей нормальной ткани. После трехлетнего наблюдения была оценена выживаемость пациенток в зависимости от уровня экспрессии miR-21 и miR-210. Для miR-210 через 3 года уровень выживаемости составил 48,65% для пациенток из группы с высокой экспрессией и 83,87% для группы с низкой экспрессией. Таким образом, уровень экспрессии miR-210 на этапе хирургического лечения потенциально может являться фактором прогноза выживаемости [5].

В биоинформатическом исследовании данных публичного репозитория геномных данных Gene Expression Omnibus было проведено сравнение уровней экспрессии микроРНК у пациенток с гормон-чувствительными HER2-негативными карциномами молочной железы с метастазами или без. В результате было выявлено, что уровни экспрессии miR-891a-5p, miR-383-5p и miR-1295a были значительно понижены у пациенток с метастазами по сравнению с пациентками без метастазов. Это может свидетельствовать об антиметастатической роли этих микроРНК. В то время как уровни экспрессии miR-128-3p, miR-661 и miR-296-3p были значительно выше у пациенток с метастазами, что может говорить об их прометастатической активности. Кроме того, низкие уровни экспрессии miR-891a-5p, miR-383-5p и miR-1295a или высокие уровни экспрессии miR-128-3p, miR-661 и miR-296-3p были ассоциированы с более низким периодом безрецидивной выживаемости, что подтверждено при исследовании клинической когорты [6].

Роль микроРНК в прогнозировании общей выживаемости и исходов неoadъювантного лечения трастузумабом у пациенток с HER2-позитивным раком молочной железы также была исследована. В эксперименте осуществлялся забор венозной крови на разных этапах химиотерапии и оценивался уровень экспрессии микроРНК в сыворотке методом ПЦР в реальном времени. Результаты показали, что до старта терапии уровни сывороточной экспрессии miR-10b, miR-21, miR-34a, miR-25b, miR-145, miR-155, и miR-373 были значительно выше у пациенток с раком молочной железы, чем у здоровых добровольцев. А уровни miR-210 и miR-122 были сравнимы с контрольной группой. В ходе неoadъювантной терапии трастузумабом были оценены уровни сывороточной экспрессии miR-210 в начале, в конце 2-го цикла и в конце. Было выявлено, что у пациенток, демонстрировавших ответ на терапию, уровень miR-210 был значительно ниже на всех этапах, чем в случае резистентности. Также у пациенток с более низким уровнем экспрессии miR-210 был выше уровень общей выживаемости ($p < 0,001$) и больше период безрецидивной выживаемости ($p < 0,001$), чем у пациенток с повышенным уровнем сывороточной экспрессии miR-210 [7].

Эти данные подтверждают многочисленные свидетельства о потенциальной значимости уровня экспрессии miR-210 как прогностического маркера при HER2-позитивном раке молочной железы, и в частности для предсказания успеха лечения трастузумабом.

В другом исследовании были проанализированы уровни экспрессии miR-21 в сыворотке крови у 20 пациенток с метастатическим HER2-позитивным раком молочной железы. Уровень базальной экспрессии miR-21 был выше у тех пациенток, которые впервые выявлены на стадиях III–IV, чем у пациенток, заболевание которых впервые



выявлено на стадиях I–II. Через 3 месяца от измерения базального уровня экспрессии и начала терапии трастузумабом в монотерапии или в составе комбинированного лечения был осуществлен повторный забор крови и проанализирован уровень экспрессии miR-21 с помощью обратной полимеразной цепной реакции в реальном времени. Анализ показал, что уровень экспрессии miR-21 значительно снизился относительно базального уровня ($p=0,001$). Для оценки прогностической значимости данного биомаркера уровень экспрессии был оценен относительно безрецидивного периода. Была выявлена значительная обратная корреляция между базальным уровнем экспрессии ($p=0,03$) и величиной безрецидивного периода, а также между уровнем экспрессии после 3 месяцев лечения трастузумабом ($p=0,01$) и величиной безрецидивного периода [8].

По разнящимся данным, среди пациенток с метастатическим HER2-позитивным раком молочной железы около 30% развивают резистентность к трастузумабу, таким образом не только подвергаются риску нежелательных реакций, но и теряют время для назначения эффективной терапии [9].

Для определения биомаркеров ответа на терапию трастузумабом были исследованы профили экспрессии микроРНК 386 пациенток с метастатическим HER2+ раком молочной железы, получавших трастузумаб в первой линии терапии в комбинации с химиотерапией, и 179 пациенток, не получавших трастузумаб при такой же патологии. Период наблюдения в среднем составил 31 месяц для группы с трастузумабом и 24 месяца для группы без трастузумаба. В результате исследования были определены 4 микроРНК (miR-940, miR-451a, miR-16-5p и miR-17-3p), чья экспрессия составляет микроРНК-сигнатуру. Уровень экспрессии данной сигнатуры значительно коррелировал с частотой объективного ответа, величиной безрецидивного периода и общей выживаемостью. Как единый параметр, данная сигнатура показала 73,16% специфичности и 75,43% чувствительности в предсказании терапевтического эффекта трастузумаба [5].

В настоящем исследовании получены новые интересные данные относительно экспрессии микроРНК в непосредственном субстрате метастазов – циркулирующих опухолевых клетках.

■ ВЫВОДЫ

1. Циркулирующие опухолевые клетки у пациентов, страдающих раком молочной железы, характеризуются генетической и фенотипической гетерогенностью, проявляющейся изменением уровня экспрессии микроРНК (miR-21, miR-155, miR-221, miR-210, miR-542-3p, miR-31, miR-17, let-7a, let-7c), онкогенов HER2-neu, BIRC5, а также генов химиорезистентности семейства ABC-транспортеров (ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCC10, ABCG2).
2. Изменения экспрессии микроРНК в ЦОК выявлены в 94,0% случаев, при этом экспрессия онкосупрессорных микроРНК (miR-31, miR-17, let-7a, let-7c) характеризуется низким уровнем, онкогенных микроРНК (miR-21, miR-155, miR-221, miR-542-3p) – высоким ($p<0,05$).
3. Высокий уровень экспрессии онкогенных микроРНК miR-21 ($p=0,006$), miR-155 ($p=0,009$) и miR-542-3p ($p=0,005$) в ЦОК коррелирует с HER2-neu-положительным РМЖ.

4. Уровень экспрессии микроРНК miR-21, miR-155 и miR-542-3p в ЦОК наряду с уровнем экспрессии HER2-neu, BIRC5, а также генов химиорезистентности семейства ABC-транспортеров (ABCB1, ABCC1, ABCC5, ABCC10, ABCG2) может быть использован в качестве дополнительного критерия при оценке прогноза течения заболевания и персонализации лечения у пациентов с HER2-neu-положительным РМЖ.
 5. Отсутствие эффекта от терапии трастузумабом может быть обусловлено у части пациентов развитием резистентности ЦОК к моноклональному антителу трастузумабу, что подтверждается сохранением и наличием в периферической крови ЦОК (в 37,5% случаев), в которых определяются высокие уровни экспрессии онкогенных микроРНК, главным образом miR-21 ($\geq 4,17$), miR-221 ($\geq 4,96$), miR-542-3p ($\geq 6,15$), с отсутствием или низким уровнем экспрессии онкосупрессорных микроРНК (miR-31, miR-17, let-7a, let-7c). Также в данных ЦОК определяется высокий уровень экспрессии гена антиапоптотического протеина сурвивина BIRC5 и резкое снижение экспрессии гена рецептора эпидермального фактора роста HER2-neu, что, возможно, обусловлено влиянием онкогенных микроРНК.
 6. Сохранение в периферической крови ЦОК с высокой экспрессией онкогенных микроРНК статистически значимо увеличивает риск прогрессирования рака молочной железы на фоне терапии трастузумабом (ОР 18,33; 95% ДИ 2,672–125,810).
-

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Lianidou E.S., Markou A., Strati A. Molecular characterization of circulating tumor cells in breast cancer: challenges and promises for individualized cancer treatment. *Cancer Metastasis Rev.* 2012;31:663–671. doi: 10.1007/s10555-012-9366-8
2. Zhang L., Riethdorf S., Wu G. Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2012;18:5701–5710. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1587.
3. Pantel K., Alix-Panabières C. Detection methods of circulating tumor cells. *J Thorac Dis.* 2012;4:446–447. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2012.08.15
4. Yang F., Fu Z., Yang M. Expression pattern of microRNAs related with response to trastuzumab in breast cancer. *J of Cellular Physiology.* 2019;1–12. doi: 10.1002/jcp.28268
5. Xiaofei W.U. Expressions of miR-21 and miR-210 in Breast Cancer and Their Predictive Values for Prognosis. *Iran J Public Health.* 2020;49(1):21–29.
6. Zhang Z., Xu L., He L. MiR-891a-5p as a prognostic marker and therapeutic target for hormone receptor-positive breast cancer. *J Cancer.* 2020;11(13):3771–3782. doi: 10.7150/jca.40750.
7. Liu B., Su F., Lv X. Serum microRNA-21 predicted treatment outcome and survival in HER2-positive breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy combined with trastuzumab. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 2019;84(5):1039–1049. doi: 10.1007/s00280-019-03937-9
8. Badr M., Said H., Louka M. L. MicroRNA-21 as a predictor and prognostic factor for trastuzumab therapy in human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *Journal of Cellular Biochemistry. J Cell Biochem.* 2018;1–8. doi: 10.1002/jcb.27620.
9. Valero V. Multicenter phase III randomized trial comparing docetaxel and trastuzumab with docetaxel, carboplatin, and trastuzumab as first-line chemotherapy for patients with HER2-gene-amplified metastatic breast cancer (BCIRG 007 study): two highly active therapeutic regimens. *J. Clin. Oncol.* 2011;29:149–156. doi: 10.1200/JCO.2010.28.6450
10. Li H., Liu J., Chen J A serum microRNA signature predicts trastuzumab benefit in HER2-positive metastatic breast cancer patients. *Nat Commun.* 2018;9(1):1614. doi: 10.1038/s41467-018-03537-w