

Взаимосвязь компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы

Т.А. Дронова^{1,2}, Н.Н. Бабьшкіна^{1,2}, М.В. Завьялова¹⁻³, С.В. Паталяк¹, Е.М. Слонимская^{1,3},
Н.В. Чердынцева^{1,2}, Ю.Г. Кжышкова^{2,4}

¹Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН»; Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный 5;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; Россия, 634050 Томск, пр-т Ленина, 36;

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 2;

⁴Университет Гейдельберга; Германия, Маннхайм

Контакты: Татьяна Анатольевна Дронова tanyadronova@mail.ru

Введение. Резистентность к гормональной терапии тамоксифеном обусловлена комплексом взаимоотношений сигнальных каскадов рецепторов факторов роста с эстрогеновыми рецепторами.

Цель исследования — комплексная оценка экспрессии матричной РНК (мРНК), белковой экспрессии и полиморфизма генов основных компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути во взаимосвязи с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы (РМЖ).

Материалы и методы. В исследование включены 95 больных РМЖ, получавшие адъювантную терапию тамоксифеном, из которых у 31 пациентки наблюдалось прогрессирование заболевания на фоне тамоксифена (тамоксифен-резистентная группа), 64 больных составили группу без признаков прогрессирования (тамоксифен-чувствительная группа). Генотипирование полиморфных локусов генов ESR1 (rs2077647, rs2228480, rs1801132), EGFR (rs1468727, rs2227983), AKT1 (rs1130233) и PTEN (rs11202592) проведено с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Для оценки экспрессии мРНК генов ESR1, EGFR, AKT1, PTEN использовали метод количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. Иммуногистохимически проведено изучение экспрессии ERα, EGFR, Akt (pS473) и PTEN. Показатели безрецидивной выживаемости больных РМЖ проанализированы с помощью кривых Каплана–Майера.

Результаты. Показано, что мутантный аллель C rs2077647 гена ESR1 чаще встречается в опухолях, чувствительных к тамоксифену, по сравнению с опухолями, резистентными к данной терапии ($p = 0,044$). Для тамоксифен-чувствительных опухолей отмечен высокий уровень экспрессии мРНК гена AKT1 по сравнению с тамоксифен-резистентными ($7,27 \pm 5,29$ и $0,02 \pm 0,01$ соответственно, $p = 0,014$). Носительство мутантного генотипа GG rs2228480 гена ESR1 ассоциировано с резистентностью к терапии тамоксифеном ($p = 0,028$). Уровень экспрессии EGFR и Akt (pS473) значимо выше в тамоксифен-резистентной группе по сравнению с тамоксифен-чувствительной ($p = 0,006$ и $0,037$ соответственно). Безрецидивная выживаемость была значимо меньше у пациенток с мутантными генотипами гена ESR1 rs2228480 по сравнению с носительством диких и гетерозиготных вариантов (log rank $p = 0,043$). Наличие положительного уровня экспрессии в опухоли EGFR или Akt (pS473) ассоциировано с низкими показателями безрецидивной выживаемости исследуемой группы пациентов (log rank $p = 0,014$ и $0,048$ соответственно).

Заключение. В качестве потенциальных маркеров, ассоциированных с чувствительностью/резистентностью опухоли к гормональной терапии тамоксифеном, могут рассматриваться полиморфные сайты гена ESR1, экспрессия мРНК AKT1 и уровень экспрессии EGFR и Akt (pS473).

Ключевые слова: эстрогензависимый рак молочной железы, тамоксифен, EGFR/PI3K/AKT-сигнальный каскад, полиморфизм генов

Для цитирования: Дронова Т.А., Бабьшкіна Н.Н., Завьялова М.В. и др. Взаимосвязь компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2018;5 (3):40–50.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-40-50

Relation of EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients with estrogen-dependent breast cancer

T.A. Dronova^{1,2}, N.N. Babyshkina^{1,2}, M.V. Zavyalova¹⁻³, S.V. Patalyak¹, E.M. Slonimskaya^{1,3},
N.V. Cherdynceva^{1,2}, J.G. Kzhyshkowska^{2,4}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences;
5 Kooperativny Pereulok, Tomsk 634009, Russia;

²National Research Tomsk State University; 36 Lenina Prospekt, Tomsk 634050, Russia;

³Siberian State Medical University; 2 Moskovskiy Trakt, Tomsk 634050, Russia;

⁴University of Heidelberg, Mannheim, Germany

Background. It is generally accepted that crosstalk between the growth factor receptor and ER pathways implicated in tamoxifen resistance. The aim of the study was to examine the relationship between mRNA level, protein expression and gene polymorphism of the EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients with estrogen-dependent breast cancer.

Materials and methods. The study included 95 breast cancer patients who had received adjuvant tamoxifen, of which 31 patients developed recurrence/metastasis after tamoxifen treatment (tamoxifen resistance group), 64 patients did not develop any diseases progression (tamoxifen sensitive group) during the 5 years of follow-up. Genotypes for ESR1 (rs2077647, rs2228480, rs1801132), EGFR (rs1468727, rs2227983), AKT1 (rs1130233) and PTEN (rs11202592) were analyzed using a TaqMan assay. Using reverse transcription-PCR, the relative expression of mRNA for ESR1, EGFR, AKT1 and PTEN was determined. ER α , EGFR, Akt (pS473) and PTEN expression level was evaluated using immunohistochemistry. Progression-free survival (PFS) was estimated by Kaplan – Meier analysis.

Results. The minor allele of ESR1 rs2077647 was more prevalent in tamoxifen sensitive tumors compared to tamoxifen resistant tumors ($p = 0.044$). We found high AKT1 mRNA expression level in tamoxifen sensitive group compared with tamoxifen resistance patients (7.27 ± 5.29 and 0.02 ± 0.01 , respectively, $p = 0.014$). ESR1 rs2228480 was significantly associated with tamoxifen resistance ($p = 0.028$). EGFR and Akt (pS473) protein expression level was significantly higher in the tamoxifen resistance group compared to tamoxifen sensitive breast cancer patients ($p = 0.006$ and 0.037 , respectively). Patients carrying mutant genotypes of ESR1 rs2228480 had a poorer progression-free survival than those carrying wild and heterozygous variants (log rank $p = 0.043$). Positive EGFR tumor expression as well as positive Akt (pS473) expression were significantly associated with shorter PFS (log rank $p = 0.014$ and 0.048 , respectively).

Conclusion. Polymorphic sites of the ESR1 gene, AKT1 mRNA expression, EGFR expression level and Akt (pS473) protein expression can be potential molecular markers associated with tumor sensitivity/resistance to tamoxifen treatment.

Key words: estrogen-dependent breast cancer; tamoxifen; EGFR/PI3K/AKT signaling; gene polymorphism

For citation: Dronova T.A., Babyshkina N.N., Zavyalova M.V. et al. Relation of EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients with estrogen-dependent breast cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):40–50.

Введение

Тамоксифен, селективный модулятор эстрогеновых рецепторов, остается в настоящее время базисным препаратом гормональной терапии как ранних, так и распространенных форм эстрогензависимого рака молочной железы (PMЖ) [1, 2]. Способность тамоксифена конкурировать с эстрогенами за связывание с эстрогеновыми рецепторами α (ER α) приводит к частичному блокированию ER α -сигнального пути, что в значительной степени способствует снижению пролиферативного эффекта стероидов. Использование тамоксифена в адьювантном режиме позволяет значительно увеличить показатели безрецидивной выживаемости больных PMЖ [3]. Однако высокий риск развития рецидива или прогрессирования заболевания на фоне адьювантного применения тамоксифена существенно ограничивает его эффективность [4].

Резистентность к антиэстрогенной терапии – мультифакториальная проблема, в которой задействовано множество сигнальных путей, в том числе сигнальные каскады рецепторов факторов роста, которые взаимодействуют как с эстрогеновыми рецепторами, так и внутриклеточными путями, такими как PI3K/AKT/mTOR [5, 6].

Рецептор эпидермального фактора роста EGFR (HER1/ErbB1), член семейства белков ErbB, является одним из важнейших компонентов PI3K/AKT-сигналинга, осуществляющего регуляцию клеточной пролиферации и злокачественной трансформации клеток при PMЖ [7]. EGFR-PI3K-взаимодействие опосредовано адаптерным белком GAB1, содержащим канонические

сайты связывания с PI3K, что приводит к аллостерической активации каталитической субъединицы p110 PI3K и образованию фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфатов (PIP3), необходимых для последующих реакций фосфорилирования Akt [8]. Уровень PIP3 находится под регуляторным контролем противоположно направленных эффекторных реакций PI3K и фосфатазы PTEN [9].

Многочисленные экспериментальные и клинические данные демонстрируют, что гиперэкспрессия EGFR определяет резистентность к тамоксифену в эстроген-положительных опухолях молочной железы [10–12]. Результаты ранее проведенных нами исследований также подтвердили прогностическую значимость статуса экспрессии EGFR как маркера неэффективности адьювантной терапии тамоксифеном [13]. Данные литературы свидетельствуют о том, что высокий уровень экспрессии Akt ассоциирован с низкими показателями общей выживаемости у больных PMЖ, получавших тамоксифен [14]. Напротив, низкий уровень экспрессии PTEN либо потеря экспрессии PTEN коррелирует с развитием рецидива на фоне приема тамоксифена у пациентов с PMЖ, что определяет неблагоприятный исход заболевания [15]. Однако, несмотря на убедительные данные, свидетельствующие о вовлечении EGFR/PI3K-ассоциированных белков в механизмы неэффективности тамоксифена, системный подход к оценке их прогностической значимости у больных эстрогензависимым PMЖ отсутствует.

Цель исследования – комплексная оценка экспрессии матричной РНК (мРНК), белковой экспрессии

и полиморфизма генов основных компонентов EGFR/PI3K/АКТ-сигнального пути во взаимосвязи с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым РМЖ.

Материалы и методы

В исследование были включены 95 пациенток с впервые выявленным операбельным РМЖ (Т1–4N0–3M0), получавших лечение в отделении общей онкологии НИИ онкологии Томского НИМЦ с 2002 по 2014 г. Средний возраст больных составил $54,5 \pm 0,9$ года (30–79 лет). У всех пациенток диагноз эстрогензависимого РМЖ подтвержден морфологически. Определение молекулярного подтипа опухоли проводили иммуногистохимически на основе маркеров ER α , PR, HER2 и Ki-67. Люминальный подтип А РМЖ (опухоль с отрицательной экспрессией HER2, положительной экспрессией рецепторов к эстрогенам и прогестерону и пролиферативной активностью менее 20 %) выявлен у 62 (65,3 %) больных, люминальный подтип В (эстроген/прогестерон рецептор-положительные опухоли как с положительной, так и с отрицательной экспрессией HER2 и высоким уровнем пролиферативной активности ≥ 20 %) – у 33 (34,7 %) пациенток.

Все больные получали комбинированное лечение в объеме оперативного вмешательства, а также гормональной терапии и химиотерапии по показаниям. Адъювантная химиотерапия в виде 4–6 курсов по схеме FAC была проведена 33 (35,5 %) пациенткам. Все больные в адъювантном режиме получали тамоксифен в стандартной дозе 20 мг/сут. Оценка эффективности лечения проводили на основании наличия или отсутствия прогрессирования заболевания, по результатам которой сформированы 2 группы: тамоксифен-чувствительная (больные без выявленных отдаленных метастазов; $n = 64$), и тамоксифен-резистентная (больные с прогрессированием заболевания; $n = 31$). Все случаи прогрессирования были отмечены на фоне адъювантной терапии тамоксифеном. Среднее время до прогрессирования составило $28,5 \pm 17,8$ мес. Исследуемые группы пациенток были сопоставимы по основным клинико-морфологическим признакам и объему проведенного лечения (табл. 1).

Для оценки экспрессии исследуемых генов использованы образцы опухолевой и прилегающей нормальной ткани, полученные во время оперативного вмешательства. Образцы помещали в раствор RNAlater (Ambion, США) и сохраняли при температуре -80 °С (после 24-часовой инкубации при температуре $+4$ °С) для дальнейшего выделения РНК. Белковые продукты исследуемых генов и их полиморфные варианты были изучены в образцах опухолевой ткани, фиксированных в 10 % рН-нейтральном растворе формалина. Продолжительность фиксации составляла не более 18–24 ч. Проводку образцов осуществляли по стандартной методике.

Для оценки полиморфизма генов *ESR1* (rs2077647, rs2228480, rs1801132), *EGFR* (rs1468727, rs2227983),

AKT1 (rs1130233) и *PTEN* (rs11202592) из опухолевых образцов с помощью наборов QIAamp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Германия) выделена тотальная ДНК. Качественную и количественную оценку ДНК проводили на спектрофотометре NanoDrop 1000 (NanoDrop, США). Изучение исследуемых полиморфных локусов выполняли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Последовательность праймеров и проб подбирали с использованием программы OligoAnalysisVector NTI и генетического банка данных www.ncbi.nlm.nih.gov (табл. 2). Реакционная смесь в объеме 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 Трис-НСl (рН 8,5 при температуре 25 °С), 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, Россия). Программу амплификации осуществляли в несколько этапов: денатурация при температуре 95 °С в течение 2 мин с последующими 40 циклами при температуре 95 °С в течение 10 с; отжиг 30 с при специфической температуре для каждой пары праймеров.

Уровень экспрессии генов *ESR1*, *EGFR*, *AKT1*, *PTEN* оценивали с помощью количественной обратной транскриптазной ПЦР на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad, США). Дизайн праймеров и TaqMan-зондов представлен в табл. 3. ПЦР ставили в 3 повторах в объеме 15 мкл, содержащем 250 мкМ dNTPs (Sibenzyme, Россия), 300 нМ прямого и обратного праймеров, 200 нМ зонда, 2,5 мМ MgCl₂, 19 SE buffer (67 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при температуре 25 °С), 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % Tween-20), 2,5 ед. HotStart Taq polymerase (Sibenzyme, Россия) и 50 нг комплементарной ДНК. Двухшаговая программа амплификации включала 1 цикл – 94 °С, 10 мин – предварительная денатурация; 40 циклов – 1-й шаг 94 °С, 10 с и 2-й шаг 60 °С, 20 с. Проверку чистоты ПЦР-продуктов проводили с использованием электрофореза в 2,5 % агарозном геле с 0,2 % бромистым этидием. Относительную экспрессию генов *ESR1*, *EGFR*, *AKT1*, *PTEN* определяли с помощью метода 2^{- $\Delta\Delta$ CT}. Уровень экспрессии исследуемых генов нормировали по референсному гену *GAPDH*.

Изучение экспрессии ER α , EGFR, Akt (pS473) и PTEN проводили на парафиновых срезах иммуногистохимическим способом по стандартному протоколу. Использовали антитела фирмы Dako к рецепторам эстрогенов (клон 1D5, RTU, мышинные), EGFR (клон SP9, 1:100), Akt (pS473) (клон 14–5, 1:50) и PTEN (клон 6H2.1, 1:100). Экспрессию ER α оценивали количественным методом гисто-счета (Histo-Score). При этом подсчитывали процент положительных клеток и показатель экспрессии в баллах. Экспрессию EGFR, Akt (pS473) и PTEN оценивали в процентном содержании положительно окрашенных клеток в 10 полях зрения на 1000 клеток. При анализе экспрессии EGFR,

Таблица 1. Клинико-морфологические параметры больных исследуемых групп

Table 1. Clinical and morphological parameters of the patients in the examined groups

Параметр Parameter	Тамоксифен-чувствительная группа, n (%) Tamoxifen-sensitive group, n (%)	Тамоксифен-резистентная группа, n (%) Tamoxifen-resistant group, n (%)	p
Возраст, лет: Age, years: ≤50 >50	35 (54,7) 29 (45,3)	13 (41,9) 18 (58,1)	0,343
Состояние менструальной функции: Menstrual function status: сохранена preserved менопауза menopause	42 (65,6) 22 (34,4)	14 (45,2) 17 (54,8)	0,093
Размер опухоли: Tumor size: T1 T2 T3–4	33 (51,5) 30 (46,9) 1 (1,6)	14 (45,2) 17 (54,8) 0 (0,0)	0,673 (T1 против T3–4) 0,673 (T1 versus T3–4)
Регионарные лимфатические узлы: Regional lymph nodes: N0 N1–3	44 (68,7) 20 (31,3)	18 (58,1) 13 (41,9)	0,426
Гистологический тип: Histological type: протоковый ductal дольковый lobular другие other	51 (79,7) 9 (14,1) 4 (6,2)	27 (87,1) 3 (9,7) 1 (3,2)	0,471 (протоковый против долькового) 0,471 (ductal versus lobular)
Адьювантная химиотерапия: Adjuvant chemotherapy: проводилась was administered не проводилась was not administered	24 (37,5) 40 (62,5)	11 (35,5) 20 (64,5)	0,971

Примечание. N0 – без признаков поражения метастазами регионарных лимфатических узлов; N1–3 – метастазы в регионарных лимфатических узлах.

Note. N0 – absence of signs of metastatic lesions in the regional lymph nodes; N1–3 – metastases in the regional lymph nodes.

Akt (pS473) и PTEN учитывали положительное мембранное и/или цитоплазматическое окрашивание (рис. 1).

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.0 и SPSS 21.0. Распределение генотипов исследованных полиморфных локусов проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Для проверки гипотезы о значимости различий между исследуемыми группами использовали критерий согласия χ^2 или двусторонний критерий Фишера. Безрецидивную выживаемость больных РМЖ анализировали с помощью кривых Каплана–Майера и *log rank*-теста. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Работа проведена с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии

с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 № 2288) на основании разрешения локального комитета по био-медицинской этике НИИ онкологии Томского НИМЦ.

Результаты

Результаты генотипирования полиморфных локусов генов *ESR1* (rs2077647, rs2228480, rs1801132), *EGFR* (rs1468727, rs2227983), *AKT1* (rs1130233) и *PTEN* (rs11202592) у больных РМЖ представлены в табл. 4. Показано, что мутантный аллель C rs2077647 гена *ESR1* чаще встречается в опухолях, чувствительных к тамоксифену по сравнению с опухолями, резистентными к данной терапии (60,8 и 44,0 % соответственно; $p = 0,044$). Кроме того, выявлено, что тамоксифен-чувствительную

Таблица 2. Последовательность олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов для анализа полиморфизма исследуемых генов

Table 2. Oligonucleotide primer and TaqMan probe sequences for analysis of polymorphisms in the studied genes

Локус Locus	Последовательность праймеров, 5'–3' 5'–3' primer sequence	Последовательность зондов, 5'–3' 5'–3' probe sequence	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C
<i>ESR1</i> rs2228480	GCTCTACTTCATCGCATTTCCT TGCAGCAGGGATTATCTGAAC	FAM-AGGGTTTCCCTGCCACAGTCTG ROX-TTCCCTGCCACGGTCTGAGAG	60
<i>ESR1</i> rs2077647	CACGGACCATGACCATGAC GCTCCAGCTCGTTCCTT	FAM-CCACACCAAAGCATCCGGGA ROX-TCCACACCAAAGCATCTGGGATG	57
<i>ESR1</i> rs1801132	CCAGATGGTCAGTGCCTTG CTGAAGGGTCTGGTAGGATCA	FAM-ATGCTGAGCCCCGATACTCTA ROX-ATGCTGAGCCCCCATACTCTA	60
<i>EGFR</i> rs1468727	CCTGTTTTACTCTCTGGGCAT ATTATGTGATTTGTTCTGAGCCTAT	FAM-TATTTAGGAGCAGGATAAGAGGACCA ROX-GGAGTAGGATAAGAGGACCAAGTTCA	60
<i>EGFR</i> rs2227983	AGGTCTGCCATGCCTTGT CTTGCCACGCATTCCCT	FAM-AGCCCAAGGACTGCGTCTCTT ROX-GAGCCCAGGGACTGCGTCT	60
<i>AKT1</i> rs1130233	GTGTGCCTCAGGTTGCG TCCAGGGCTGACACAATCT	FAM-GGAACGTGTGTTCTCCGAGGA ROX-CACCGTGTCTTCTCCGAGGAC	60
<i>PTEN</i> rs11202592	GCTTCTGCCATCTCTCTCCT GTTTCTGCTAACGATCTCTTTGA	FAM-TTTTCTTCAGCCACAGGGTCC ROX-CACAGGCTCCAGACATGACA	60

Таблица 3. Последовательность олигонуклеотидных праймеров и TaqMan-зондов для анализа экспрессии исследуемых генов

Table 3. Oligonucleotide primer and TaqMan probe sequences for expression analysis of the studied genes

Ген Gene	Последовательность праймеров, 5'–3' 5'–3' primer sequence	Последовательность зондов, 5'–3' 5'–3' probe sequence
<i>ESR1</i>	CAGGGTGGCAGAGAAAGATT GTAGCGAGTCTCCTTGGA	FAM-TGACAAGGGAAGTATGGCTATGGA
<i>EGFR</i>	CTCCATGCCTTTGAGAACCTA CCAAGGATGTTATGTTCCAGGCT	FAM-CGGCAGGACCAAGCAACAT
<i>AKT1</i>	CTTCATCATCCGCTGCCT TCCTCCTCCTCCTGCTTCT	FAM-GAGGAGCGGGAGGAGTGGA
<i>PTEN</i>	AGCCGTTACCTGTGTGTGG CTGGTCTGTTATGAAGAATGTA	FAM-TCCACAAACAGAACAAGATGCTAAA

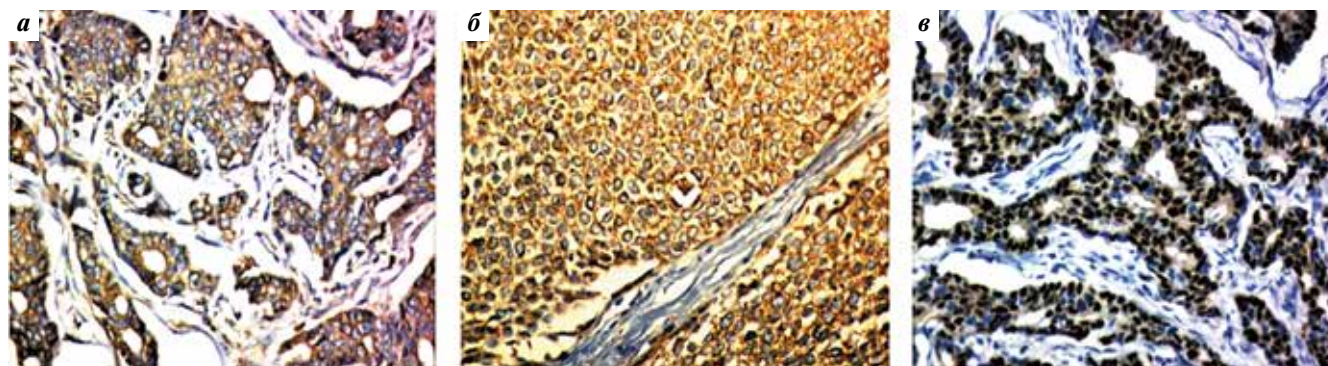


Рис. 1. Иммуногистохимически положительная экспрессия EGFR (а), Akt (pS473) (б) и PTEN (в) в опухолевой ткани молочной железы. Окраска диаминобензидином и гематоксилином (× 200)

Fig. 1. Immunohistochemically positive expression of EGFR (a), Akt (pS473) (b), and PTEN (c) in breast tumor tissue. Diaminobenzidine and hematoxylin staining (× 200)

Таблица 4. Распределение генотипов и аллелей генов *ESR1*, *EGFR*, *AKT1*, *PTEN* у больных исследуемых группTable 4. Distribution of *ESR1*, *EGFR*, *AKT1*, *PTEN* gene genotypes and alleles in patients of the studied groups

Генотип/аллель Genotype/allele	<i>n</i>	Тамоксифен-чувствительная группа, <i>n</i> (%) Tamoxifen-sensitive group, <i>n</i> (%)	Тамоксифен-резистентная группа, <i>n</i> (%) Tamoxifen-resistant group, <i>n</i> (%)	<i>p</i>
<i>ESR1</i> rs2077647				
TT	23	13 (21,7)	10 (40)	0,075 TT против CC 0,075 TT versus CC
TC	27	21 (35,0)	8 (32)	
CC	33	26 (43,3)	7 (28)	
T		47 (39,2)	28 (56)	0,044
C		73 (60,8)	22 (44)	
<i>ESR1</i> rs2228480				
GG	64	46 (78)	18 (72)	0,028 GG против AA 0,028 GG versus AA
GA	17	13 (22)	4 (16)	
AA	3	0 (0)	3 (12)	
G		105 (89)	40 (80)	0,121
A		13 (11)	10 (20)	
<i>ESR1</i> rs1801132				
CC	56	37 (63,8)	19 (76)	0,593 CC против GG 0,593 CC versus GG
CG	23	18 (31,0)	5 (20)	
GG	4	3 (5,2)	1 (4)	
C		92 (79,3)	43 (86)	0,310
G		24 (20,7)	7 (14)	
<i>EGFR</i> rs2227983				
GG	43	30 (53,6)	13 (54,2)	0,656 GG против AA 0,656 GG versus AA
GA	30	20 (35,7)	10 (41,6)	
AA	7	6 (10,7)	1 (4,2)	
G		80 (71,4)	36 (75,0)	0,643
A		32 (28,6)	12 (25,0)	
<i>EGFR</i> rs1468727				
TT	43	32 (54,2)	11 (44)	0,956 TT против CC 0,956 TT versus CC
TC	13	6 (10,2)	7 (28)	
CC	28	21 (35,6)	7 (28)	
T		70 (59,3)	29 (58)	0,873
C		48 (40,7)	21 (42)	
<i>AKT1</i> rs1130233				
GG	62	43 (71,7)	19 (76)	0,491 GG против AA 0,491 GG versus AA
GA	21	15 (25,0)	6 (24)	
AA	2	2 (3,3)	0 (0)	
G		101 (84,2)	44 (88)	0,507
A		19 (15,8)	6 (12)	
<i>PTEN</i> rs11202592				
CC	31	21 (35,6)	10 (40)	0,702 CC против GG 0,702 CC versus GG
CG	53	38 (64,4)	15 (60)	
GG	0	0 (0)	0 (0)	
C		80 (67,8)	35 (70)	0,778
G		38 (32,2)	15 (30)	

группу пациентов отличает от тамоксифен-резистентной группы отсутствие мутантных генотипов GG rs2228480 гена *ESR1* (0 и 12 % соответственно; $p = 0,028$). Для других полиморфных локусов изучаемых генов значимой связи с эффективностью терапии тамоксифеном не обнаружено.

Для определения уровня транскрипционной активности генов *ESR1*, *EGFR*, *AKT1* и *PTEN* изучены парные

образцы тканей опухоли молочной железы и условно нормальной ткани в 2 группах пациенток. Выявлено, что чувствительные и резистентные опухоли отличаются по уровню экспрессии 2 генов – *ESR1* и *AKT1*. Повышение уровня экспрессии *ESR1* было характерно для тамоксифен-чувствительной группы больных по сравнению с тамоксифен-резистентной, однако

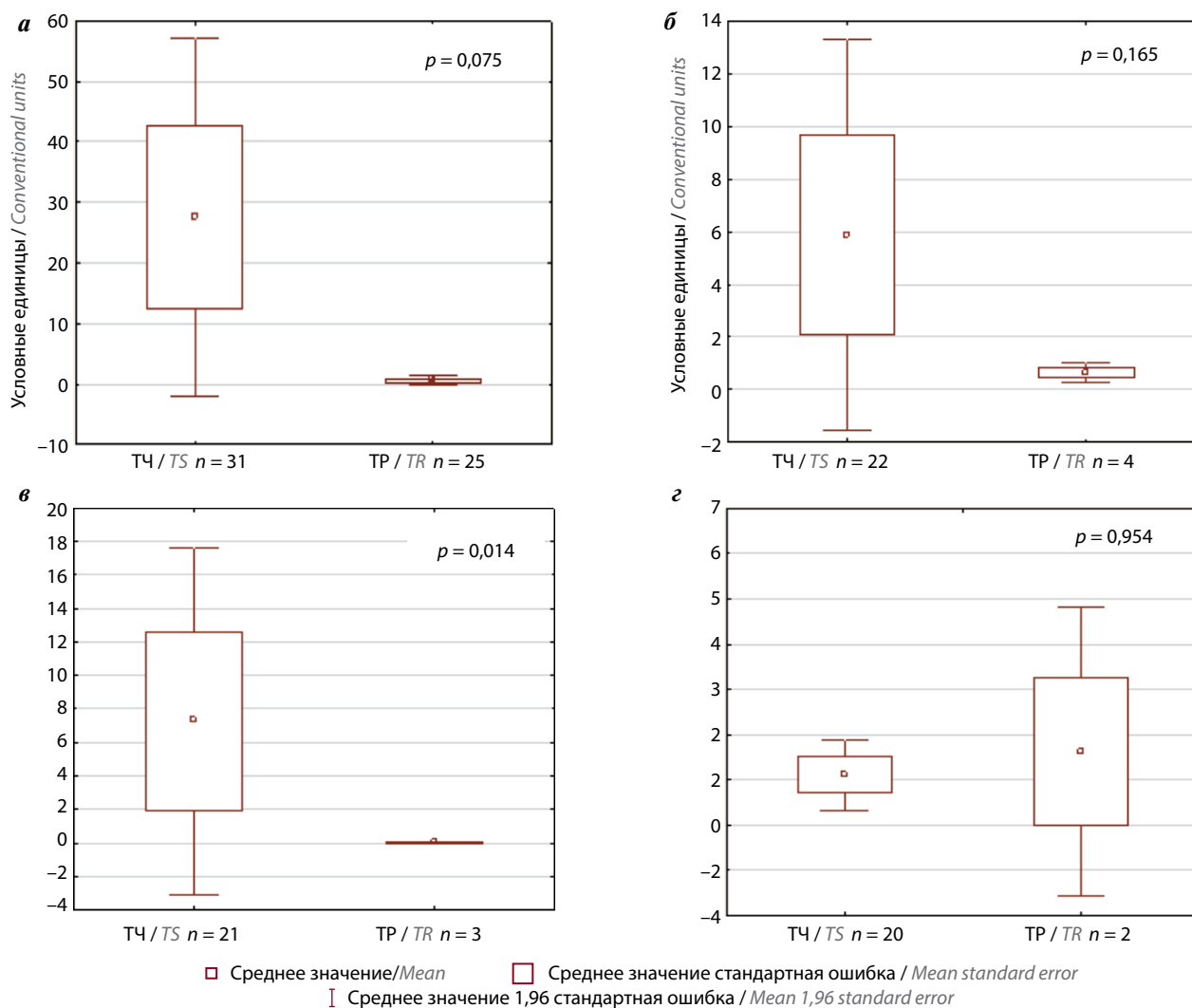


Рис. 2. Уровень экспрессии генов *ESR1* (а), *EGFR* (б), *AKT1* (в) и *PTEN* (г) у больных РМЖ в зависимости от эффективности терапии тамоксифеном. Приведены средние значения \pm SE. ТЧ – тамоксифен-чувствительная группа, TP – тамоксифен-резистентная группа

Fig. 2. *ESR1* (a), *EGFR* (б), *AKT1* (в), and *PTEN* (г) gene expression levels in patients with breast cancer depending on tamoxifen therapy effectiveness. Mean values \pm SE. TS – tamoxifen-sensitive group, TR – tamoxifen-resistant group

Таблица 5. Уровень экспрессии *EGFR*, *Akt* (pS473) и *PTEN* в образцах опухолевой ткани у больных исследуемых групп

Table 5. *EGFR*, *Akt* (pS473), and *PTEN* expression levels in the tumor tissue samples from the patients of the studied groups

Параметр Parameter	n	Тамоксифен-чувствительная группа, n (%) Tamoxifen-sensitive group, n (%)	Тамоксифен-резистентная группа, n (%) Tamoxifen-resistant group, n (%)	p
EGFR:				
отрицательная negative	38	27 (75,0)	11 (40,7)	0,006
положительная positive	25	9 (25,0)	16 (59,3)	
Akt (pS473):				
отрицательная negative	18	17 (77,3)	1 (25,0)	0,037
положительная positive	8	5 (22,7)	3 (75,0)	
PTEN:				
отрицательная negative	15	12 (54,5)	3 (75,0)	0,426
положительная positive	11	10 (45,5)	1 (25,0)	

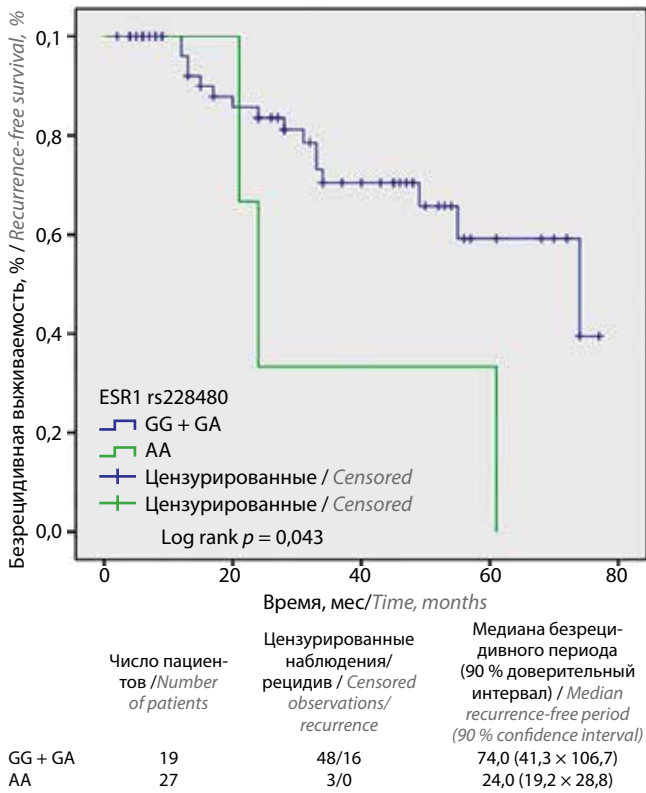
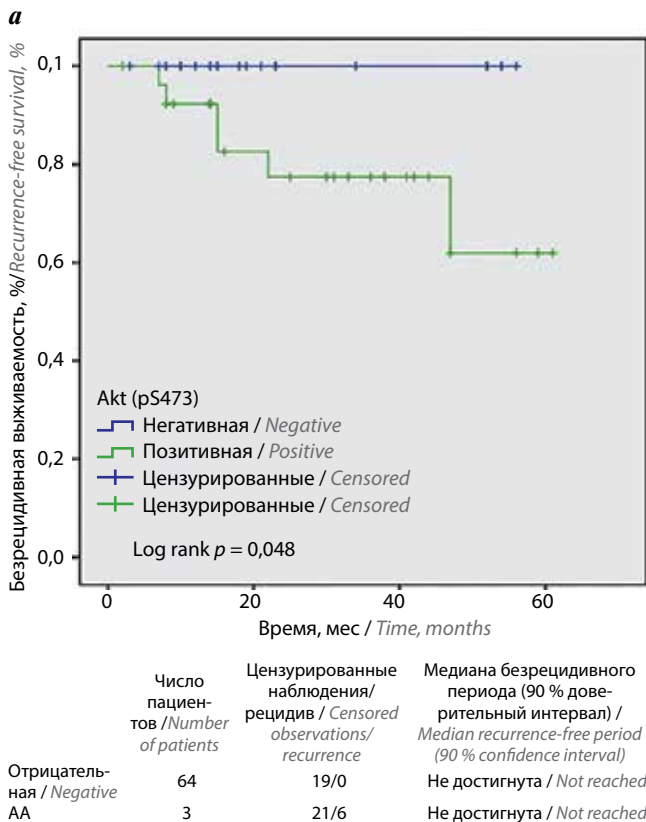


Рис. 3. Показатели безрецидивной выживаемости у больных РМЖ в зависимости от генотипов гена *ESR1* (rs2228480)
Fig. 3. Recurrence-free survival in patients with breast cancer depending on *ESR1* (rs2228480) gene genotype



различия не достигали статистической значимости ($27,56 \pm 15,07$ и $0,53 \pm 0,42$ соответственно; $p = 0,075$) (рис. 2a). Более значимое повышение содержания мРНК гена *AKT1* отмечено у пациенток с РМЖ без прогрессирования заболевания, чем среди больных, не отвечающих на терапию тамоксифеном ($7,27 \pm 5,29$ и $0,02 \pm 0,01$ соответственно; $p = 0,014$) (рис. 2в).

При изучении уровня экспрессии белковых продуктов генов *EGFR*, *AKT1* и *PTEN* показано, что риск прогрессирования заболевания на фоне тамоксифена значительно выше у больных с положительной экспрессией *EGFR* и Akt (pS473) ($p = 0,006$ и $0,037$ соответственно; табл. 5).

Для оценки потенциальной прогностической значимости исследуемых маркеров мы провели анализ безрецидивной выживаемости у пациенток с РМЖ. Выявлено, что носительство мутантного варианта гена *ESR1* rs2228480 сопряжено с низкими показателями безрецидивной выживаемости у больных эстрогензависимым РМЖ ($\log rank p = 0,043$) (рис. 3). Наличие положительного уровня экспрессии в опухоли *EGFR* и Akt (pS473) ассоциировано со значительным уменьшением времени до прогрессирования заболевания у пациентов исследуемой группы ($\log rank p = 0,014$ и $0,048$ соответственно) (рис. 4).

Обсуждение

Принимая во внимание ранее полученные нами данные о взаимосвязи высокого уровня экспрессии

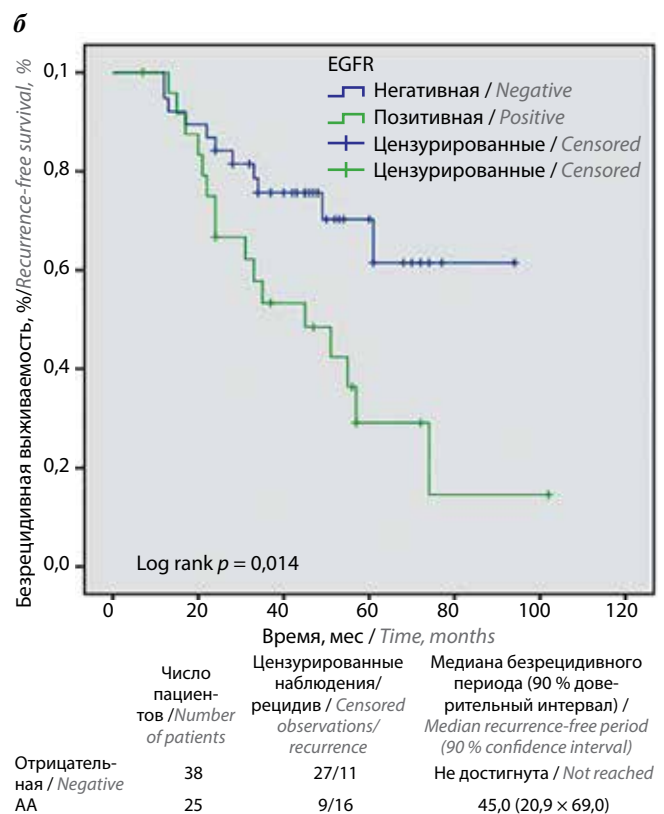


Рис. 4. Показатели безрецидивной выживаемости у больных РМЖ в зависимости от экспрессии Akt (pS473) (а) и EGFR (б)
Fig. 4. Recurrence-free survival in patients with breast cancer depending on Akt (pS473) (a) and EGFR (б) gene expression

EGFR, а также ассоциации мутантного варианта гена *ESR1* rs2228480 с низкой эффективностью гормональной терапии тамоксифеном у больных РМЖ [13], мы провели комплексную оценку основных компонентов EGFR/PI3K/АКТ-сигнального пути в группах пациентов с эстрогензависимым РМЖ, различных по эффективности лечения тамоксифеном.

В ходе настоящего исследования мы последовательно проанализировали генетическую компоненту (полиморфизм генов и уровень экспрессии мРНК), а также белковый статус EGFR/PI3K-ассоциированных факторов у больных РМЖ тамоксифен-резистентной и тамоксифен-чувствительной групп.

Мы показали, что потенциальными маркерами, определяющими чувствительность к тамоксифену, являются SNP rs2077647 гена *ESR1* и уровень экспрессии мРНК гена *AKT1*. Неэффективность терапии тамоксифеном может быть связана с наличием мутантных генотипов гена *ESR1* rs2228480 и положительного экспрессионного статуса белков EGFR и Akt (pS473). Важно, что выявленные маркеры резистентности продемонстрировали значимый прогностический потенциал в отношении показателей выживаемости у больных эстрогензависимым РМЖ.

SNP rs2077647, локализуемой в 1-м экзоне гена *ESR1*, является функционально нейтральной мутацией, которая не приводит к изменению биологической активности продукта экспрессии гена [16]. Получены данные о том, что мутантный аллель С данного полиморфного варианта является протективным фактором в отношении развития РМЖ [17, 18]. Возможно, потенциальный «благоприятный» эффект в отношении риска развития РМЖ и чувствительности к гормональной терапии обусловлен сильным неравновесным сцеплением данного полиморфизма с близко расположенными SNP локусами *ESR1*.

SNP rs2228480 представляет собой синонимичную нуклеотидную замену 8-м экзоне гена *ESR1*, функциональная роль которой полностью не известна. Однако полагают, что данная точечная мутация может способствовать нарушению сайтов связывания эстрогеновых рецепторов для взаимодействия с коактиваторами [19]. Вероятно, что результатом таких нарушений может быть образование функционально неактивного рецептора, неспособного полноценно взаимодействовать с тамоксифеном, что потенциально определяет развитие резистентности. Следует отметить, что подобные исследования связи *ESR1* rs2228480 с эффективностью тамоксифена у больных РМЖ в отечественных и зарубежных источниках отсутствуют.

Участие EGFR в механизмах резистентности к гормональной терапии в настоящее время не подлежит сомнению. Гиперэкспрессия EGFR в опухолях, не отвечающих на тамоксифен, и ее неблагоприятная прогностическая значимость у больных эстроген-положительным РМЖ продемонстрирована в настоящем исследовании и подтверждена многочисленными опубликованными данными [20–22].

В отличие от EGFR, определение экспрессии мРНК *AKT1* как потенциального маркера резистентности к тамоксифену остается в настоящее время спорным. Данные экспериментальных исследований свидетельствуют о прямой зависимости высокого уровня экспрессии *AKT1* и развития тамоксифен-чувствительного фенотипа клеток опухолевых линий РМЖ [23]. Результаты клинических работ указывают на отсутствие связи экспрессии мРНК *AKT1* с ответом на тамоксифен [24, 25]. Однако исследования, касающиеся белкового продукта гена *AKT1*, позволили выявить четкие ассоциации экспрессии Akt (pS473) с неблагоприятным исходом у больных РМЖ на фоне адъювантного применения тамоксифена [14]. Показано, что высокий уровень ядерной экспрессии Akt (pS473) коррелирует с неэффективным ответом на тамоксифен у больных РМЖ в период постменопаузы без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов [26]. Вероятно, что более существенным и информативным в прогностическом плане является уровень продукции фосфорилированной формы белка по сравнению с уровнем экспрессии мРНК, поскольку именно фосфорилирование (в большей степени по аминокислотному остатку Ser-473) определяет функциональную активность Akt.

Заключение

Таким образом, на основании проанализированных данных литературы и результатов настоящего исследования можно предполагать высокую степень активации EGFR/PI3K/АКТ-сигнального пути в опухолях, резистентных к тамоксифену, обусловленную, в том числе, значительной экспрессией EGFR и фосфорилированной формы белка Akt. Вклад в реализацию тамоксифен-чувствительного/резистентного фенотипа опухоли вносит как функциональная активность рецепторных тирозинкиназ (EGFR, в частности), обеспечивающих фосфорилирование ER α и его лиганднезависимую активацию, так и полиморфные сайты *ESR1*, затрагивающие лигандзависимые (SNP rs2228480) и лиганднезависимые (SNP rs2077647) области гена, способствующие изменению активности ER α .

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Senkus E., Kyriakides S., Penault-Llorca F. et al. Primary breast cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013;24:vi7–vi23. DOI: 10.1093/annonc/mdt284. PMID: 26314782.
2. Burstein H.J., Lacchetti C., Anderson H. et al. Adjuvant Endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on ovarian suppression. *J Clin Oncol* 2016;34(14):1689–701. DOI: 10.1200/JCO.2015.65.9573. PMID: 26884586.
3. Crew K.D., Albain K.S., Hershman D.L. et al. How do we increase uptake of tamoxifen and other anti-estrogens for breast cancer prevention? *NPJ Breast Cancer* 2017;3(20):1–7. DOI: 10.1038/s41523-017-0021-y. PMID: 28649660.
4. Pan H., Gray R., Braybrooke J. et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med* 2017;377:1836–46. DOI: 10.1056/NEJMoa1701830. PMID: 29117498.
5. Chang M. Tamoxifen resistance in breast cancer. *Biomol Ther (Seoul)* 2012;20(3):256–7. DOI: 10.4062/biomolther.2012.20.3.256. PMID: 24130921.
6. Veloso F.J., Bianco A.F., Farias J.O. et al. The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways. *Oncol Targets Ther* 2017;10:5491–524. DOI: 10.2147/OTT.S142154. PMID: 29200866.
7. Wee P., Wang Z. Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathways. *Cancers(Basel)* 2017;9(5):52. DOI: 10.3390/cancers9050052. PMID: 28513565.
8. Paplomata E., O'Regan R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Ther Adv Med Oncol* 2014;6(4):154–66. DOI: 10.1177/1758834014530023. PMID: 25057302.
9. Lee J.J., Loh K., Yap Y.S. PI3K/Akt/mTOR inhibitors in breast cancer. *Cancer Biol Med* 2015;12(4):342–54. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2015.0089. PMID: 26779371.
10. Giltneane J.M., Ryden L., Cregger M. et al. Quantitative measurement of epidermal growth factor receptor is a negative predictive factor for tamoxifen response in hormone receptor positive premenopausal breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:3007–14. DOI: 10.1200/JCO.2006.08.9938. PMID: 17634479.
11. Massarweh S., Osborne C.K., Creighton C.J. et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res* 2008;68(3):826–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2707. PMID: 18245484.
12. Kim S., Lee J., Oh S.J. et al. Differential effect of EGFR inhibitors on tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Oncol Rep* 2015;34(3):1613–9. DOI: 10.3892/or.2015.4116. PMID: 26166014.
13. Babyshkina N., Vtorushin S., Zavyalova M. et al. The distribution pattern of ER α expression, ESR1 genetic variation and expression of growth factor receptors: association with breast cancer prognosis in Russian patients treated with adjuvant tamoxifen. *Clin Exp Med* 2017;17(3):383–93. DOI: 10.1007/s10238-016-0428-z. PMID: 27225751.
14. Kirkegaard T., Witton C.J., McGlynn L.M. et al. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol* 2005;207:139–46. DOI: 10.1002/path.1829. PMID: 16088978.
15. Tanic N., Milovanovic Z., Tanic N. et al. The impact of PTEN tumor suppressor gene on acquiring resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients. *Cancer Biol Ther* 2012;13(12):1165–74. DOI: 10.4161/cbt.21346. PMID: 22892847.
16. Li T., Zhao J., Yang J. et al. A Meta-analysis of the association between ESR1 genetic variants and the risk of breast cancer. *PLoS One* 2016;11(4):e0153314. DOI: 10.1371/journal.pone.0153314. PMID: 27070141.
17. Hsiao W.C., Young K.C., Lin S.L. et al. Estrogen receptor-alpha polymorphism in a Taiwanese clinical breast cancer population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2004;6(3):180–6. DOI: 10.1186/bcr770. PMID: 15084241.
18. Fernandez L.P., Milne R.L., Barroso E. et al. Estrogen and progesterone receptor gene polymorphisms and sporadic breast cancer risk: a Spanish case-control study. *Int J Cancer* 2006;119(2):467–71. DOI: 10.1002/ijc.21847. PMID: 16477637.
19. Anghel A., Raica M., Narita D. Estrogen receptor alpha polymorphisms: correlation with clinicopathological parameters in breast cancer. *Neoplasma* 2010;57(4):306–15. PMID: 20429621.
20. Chong K., Subramanian A., Sharma A. et al. Measuring IGF-1, ER- α and EGFR expression can predict tamoxifen-resistance in ER-positive breast cancer. *Anticancer Res* 2011;31(1):23–32. PMID: 21273576.
21. Xuan Q.J., Wang J.X., Nanding A. et al. Tumor-associated macrophages are correlated with tamoxifen resistance in the postmenopausal breast cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2014;20(3):619–24. DOI: 10.1007/s12253-013-9740-z. PMID: 24414992.
22. Bae S.Y., Nam S.J., Lee S.K. et al. Tamoxifen resistance: EGFR expression in hormone receptor-positive and HER2 negative breast cancer. In: Proceedings of the 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium: Report abstract *Cancer Res* 2017;77(4):9–36. DOI: 10.1158/1538-7445.
23. van Agthoven T., Veldscholte J., Smid M. et al. Functional identification of genes causing estrogen independence of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114(1):23–30. DOI: 10.1007/s10549-008-9969-5. PMID: 18351453.
24. van Agthoven T., Godinho M.F., Wulfkuhle J.D. et al. Protein pathway activation mapping reveals molecular networks associated with antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. *Int J Cancer* 2012;131(9):1998–2007. DOI: 10.1002/ijc.27489.
25. Riggio M., Perrone M.C., Polo M.L. et al. AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep* 2017;7:44244. DOI: 10.1038/srep44244. PMID: 28287129.
26. Bostner J., Karlsson E., Pandiyan M.J. et al. Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict tamoxifen treatment benefit. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137(2):397–406. DOI: 10.1007/s10549-012-2376-y. PMID: 23242584.

Вклад авторов

Т.А. Дронова: написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

Н.Н. Бабышкина: написание текста рукописи, анализ полученных данных;

М.В. Завьялова, С.В. Паталяк: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

Е.М. Слонимская: получение данных для анализа, разработка дизайна исследования;

Н.В. Чердынцева, Ю.Г. Кжышковска: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

T.A. Dronova: article writing, reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data;

N.N. Babyshkina: article writing, analysis of the obtained data;

M.V. Zavyalova, S.V. Patalyak: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

E.M. Slonimskaya: obtaining data for analysis, developing the research design;

N.V. Cherdyntseva, J.G. Kzhyshkowska: developing the research design.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.А. Дронова/T.A. Dronova: <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>

Н.Н. Бабышкина/N.N. Babyshkina: <https://orcid.org/0000-0002-0562-3878>

М.В. Завьялова/M.V. Zavyalova: <https://orcid.org/0000-0001-9429-9813>

С.В. Паталяк/S.V. Patalyak: <https://orcid.org/0000-0002-9468-1980>

Е.М. Слонимская/E.M. Slonimskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4382-5697>

Н.В. Чердынцева/N.V. Cherdyntseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>

Ю.Г. Кжышковска/J.G. Kzhyshkowska: <https://orcid.org/0000-0003-0898-3075>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 17-29-06037 офи_м «Геномные механизмы регуляции опухолевой прогрессии рака молочной железы в условиях лекарственной терапии».

Financing. The study was supported by the grant of the Russian Foundation for Basic Research No. 17-29-06037 «Genomic regulation of the breast cancer progression during chemotherapy».

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 05.07.2018. **Принята к публикации:** 10.08.2018.

Article received: 05.07.2018. **Accepted for publication:** 10.08.2018.