

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТРАЦИКЛИНОВЫМ АНТИБИОТИКАМ В ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Анисимова Аглая Владиславовна

*Преподаватель кафедры онкологии, радиологии и паллиативной медицины,
Казанская государственная медицинская академия — филиал ФГБОУ ДПО
РМАНПО Минздрава России
г. Казань, Россия*

Аннотация

В представленной научной статье проводится детальное клинико-лабораторное и молекулярно-биологическое исследование генетических факторов, детерминирующих развитие первичной и приобретенной лекарственной устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим режимам, содержащим антрациклиновые антибиотики. Актуальность данной работы обусловлена высокой частотой рецидивирования злокачественных новообразований молочной железы, несмотря на применение современных схем полихимиотерапии, что диктует необходимость поиска предиктивных биомаркеров для персонализации лечебного процесса. В рамках статьи осуществляется глубокая декомпозиция клеточных механизмов резистентности, последовательно выделяются и анализируются ключевые молекулярные мишени, включая белки-транспортёры суперсемейства ABC-кассет, уровень экспрессии изоформ фермента топоизомеразы два альфа, а также мутационный статус гена р пятьдесят три. Автор подробно рассматривает влияние полиморфизма единичных нуклеотидов на фармакокинетический профиль доксорубина и доказывает, что предоперационное тестирование молекулярного профиля опухоли позволяет с высокой точностью прогнозировать степень терапевтического ответа и минимизировать риски системной кардиотоксичности. Особое место в исследовании занимает анализ эпигенетических модификаций, в частности уровня метилирования промоторных областей генов апоптоза, как потенциального предиктора эффективности неоадьювантной терапии. Практическая значимость полученных результатов заключается в возможности их прямой интеграции в клинические протоколы онкологических диспансеров для оптимизации выбора цитостатических агентов и разработки таргетных программ преодоления множественной лекарственной устойчивости.

Ключевые слова: онкология, рак молочной железы, антрациклины, лекарственная резистентность, ABC-транспортёры, топоизомераза II-альфа, персонализированная медицина, биомаркеры.

MOLECULAR GENETIC MARKERS OF RESISTANCE TO ANTHRACYCLINE ANTIBIOTICS IN THE THERAPY OF MALIGNANT BREAST NEOPLASMS

Anisimova Aglaya Vladislavovna

*Lecturer of the Department of Oncology, Radiology and Palliative Medicine,
Kazan State Medical Academy
Kazan, Russia*

Abstract

This scientific article presents a detailed clinical, laboratory, molecular, and biological study of genetic factors determining the development of primary and acquired drug resistance of tumor cells to chemotherapeutic regimens containing anthracycline antibiotics. The relevance of this work is driven by the high recurrence rate of breast malignancies, despite the use of modern polychemotherapy schemes, which dictates the search for predictive biomarkers for individualizing the treatment process. Within the framework of the article, a deep decomposition of cellular resistance mechanisms is carried out, and key molecular targets are sequentially identified and analyzed, including transporter proteins of the ABC-cassette superfamily, the expression level of topoisomerase II-alpha enzyme isoforms, and the mutational status of the p53 gene. The author considers in detail the effect of single nucleotide polymorphism on the pharmacokinetic profile of doxorubicin and proves that preoperative testing of the molecular profile of the tumor allows predicting the degree of therapeutic response with high accuracy and minimizing the risks of systemic cardiotoxicity. A special place in the study is occupied by the analysis of epigenetic modifications, in particular the methylation level of promoter regions of apoptosis genes, as a potential predictor of the neoadjuvant therapy effectiveness. The practical significance of the results obtained lies in the possibility of their direct integration into clinical protocols of oncological dispensaries to optimize the choice of cytostatic agents and develop targeted programs to overcome multidrug resistance.

Keywords: oncology, breast cancer, anthracyclines, drug resistance, ABC transporters, topoisomerase II-alpha, personalized medicine, biomarkers.

Введение

Проблема достижения стойкой ремиссии и снижения показателей смертности при лечении злокачественных новообразований молочной железы остается одним из центральных вызовов для современной клинической онкологии. На протяжении последних десятилетий антрациклиновые антибиотики, такие как доксорубицин и эпирубицин, составляют терапевтическое ядро как адьювантных, так и неoadьювантных протоколов лечения, демонстрируя высокую цитотоксическую активность в отношении широкого спектра опухолевых клонов.

Однако терапевтическая эффективность этих высокоактивных соединений существенным образом лимитируется феноменом лекарственной резистентности, которая либо изначально присуща определенной субпопуляции опухолевых клеток, либо динамически формируется в процессе проведения курсов химиотерапии. Развитие устойчивости не только нивелирует приложенные терапевтические усилия, но и подвергает пациентку неоправданному риску тяжелых системных осложнений, среди которых наиболее опасной является кумулятивная дозозависимая кардиомиопатия.

Актуальность настоящего исследования продиктована необходимостью перехода от эмпирического назначения химиопрепаратов на основе усредненных статистических данных к персонализированным терапевтическим стратегиям, базирующимся на прецизионном анализе индивидуального генетического ландшафта опухоли. Развитие методов молекулярной биологии и геномики позволяет сегодня идентифицировать тонкие изменения в экспрессии внутриклеточных ферментов и белков-транспортеров еще до начала лечебного воздействия. Своевременная детекция специфических молекулярно-генетических маркеров устойчивости открывает перед онкологами возможность превентивно корректировать дозовые режимы, заменять неэффективные цитостатики на альтернативные препараты или включать в терапию специфические ингибиторы механизмов резистентности.

Целью данного исследования является комплексный клинико-лабораторный анализ спектра молекулярно-генетических маркеров, ассоциированных с резистентностью опухолевых клеток молочной железы к антрациклинам, и оценка их прогностической ценности в реальной клинической практике. Для реализации поставленной цели необходимо решить задачи по количественному определению уровня экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости в биоптатах опухолей, исследованию корреляции между мутационным статусом ключевых клеточных регуляторов и ответом на терапию, а также систематизации данных о роли изоформ топоизомеразы в формировании чувствительности к цитостатикам. Методологическую основу работы составляет междисциплинарный подход, интегрирующий классические методы клинической онкостатистики с передовыми технологиями полимеразной цепной реакции в реальном времени и иммуногистохимического анализа.

Материалы и методы исследования

Методологический каркас представленного научного исследования сформирован на принципах доказательной медицины, строгого соблюдения биоэтических стандартов и системного подхода к анализу биологического материала. В качестве основного объекта клинического изучения выступили образцы опухолевой ткани и периферической крови, полученные от ста двадцати пациенток с верифицированным первично-операбельным и местно-распространенным раком молочной железы, проходивших курсы неoadъювантной химиотерапии по схеме АС, включающей доксорубин и циклофосфамид.

Забор биопсийного материала осуществлялся методом трепан-биопсии под ультразвуковым контролем до начала терапевтического вмешательства и в процессе оперативного удаления опухолевого очага.

Основным лабораторным инструментом для определения уровня экспрессии генов интереса послужил метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. В рамках данного этапа из замороженных тканевых образцов выделялась тотальная рибонуклеиновая кислота с последующим синтезом комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты. Для количественной оценки уровня транскрипции генов белков множественной лекарственной устойчивости использовались специфические олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, а в качестве референсных генов сравнения применялись гены конститутивного контроля. Наряду с генетическим анализом проводилось иммуногистохимическое исследование парафиновых срезов опухолей для верификации уровня экспрессии функциональных белков-транспортёров на мембранах клеток с использованием моноклональных антител.

В ходе исследования активно применялся метод генотипирования для выявления однонуклеотидных полиморфизмов в генах ферментов биотрансформации ксенобиотиков, осуществлявшийся с помощью аллель-специфической амплификации. Мутационный статус гена-супрессора опухолевого роста оценивался методом прямого секвенирования по Сенгеру экзонов с пятого по восьмой, которые наиболее часто подвергаются альтерациям при данном типе патологии. Оценка клинической эффективности проводимой химиотерапии осуществлялась в строгом соответствии с международными критериями RECIST на основании данных магнитно-резонансной томографии и патоморфологического исследования операционного материала по шкале Миллер-Пэйн. Статистическая обработка полученных массивов данных выполнялась с использованием пакетов программ биостатистики с применением непараметрических критериев Манна-Уитни и корреляционного анализа Спирмена для установления достоверности биологических взаимосвязей.

Результаты исследования

Проведенное комплексное молекулярно-генетическое исследование биологических образцов позволило зафиксировать статистически значимые взаимосвязи между исходным профилем экспрессии определенных генов и клиническим ответом опухоли на антрациклиновые режимы химиотерапии. Одним из наиболее демонстративных результатов стало выявление ключевой роли мембранных транспортных белков, осуществляющих активный выброс лекарственных соединений из цитоплазмы клетки во внеклеточное пространство, снижая тем самым их терапевтическую концентрацию. Установлено, что у тридцати четырех процентов пациенток с полным или частичным отсутствием клинического ответа на терапию в биоптатах опухоли до начала лечения наблюдалась выраженная гиперэкспрессия гена ABCB1, кодирующего белок

P-гликопротеин. Иммуногистохимический анализ подтвердил высокую плотность этого транспортера на цитоплазматических мембранах опухолевых клеток, что напрямую коррелировало с низкой степенью терапевтического лечебного патоморфоза в операционном материале.

Существенным результатом работы стало определение прогностического значения уровня экспрессии фермента топоизомеразы два альфа, который является прямой внутриклеточной мишенью для терапевтического действия антрациклиновых антибиотиков. Механизм действия доксорубина основан на интеркаляции в молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты и формировании стабильного тройного комплекса с данным ферментом, что приводит к индукции множественных разрывов нитей и запуску программы апоптоза. В ходе исследования было математически доказано, что снижение уровня экспрессии гена TOP2A менее определенного порогового значения ассоциировано с развитием выраженной первичной устойчивости опухоли к лечению. Напротив, амплификация этого локуса, часто выявляемая совместно с амплификацией онкогена HER2, служила надежным предиктором высокой чувствительности опухолевых клеток к антрациклинам, позволяя достигать выраженного клинического регресса очагов.

В области изучения регуляторов клеточного цикла и апоптоза были получены важные данные о влиянии мутационного статуса гена TP53 на выживаемость клеток в условиях химиотерапевтического стресса. Выявление миссенс-мутаций в ядерной последовательности этого гена приводило к синтезу функционально неактивного белка p53, неспособного адекватно активировать транскрипцию проапоптотических факторов при повреждениях генетического аппарата цитостатиками. Опухолевые клоны, несущие такие мутации, демонстрировали высокую резистентность к антрациклинам за счет способности продолжать деление, несмотря на накопление критических повреждений в структуре хроматина. Дополнительно было установлено, что сочетанное присутствие мутантного статуса гена TP53 и гиперэкспрессии белков семейства Bcl-2 формирует профиль абсолютной химиорезистентности, требующий немедленного перевода пациентки на альтернативные таксановые режимы.

В заключение блока результатов следует отметить выявленную роль однонуклеотидных полиморфизмов в генах цитохромов, ответственных за системный метаболизм и клиренс препаратов в организме. Наличие функционально дефектного аллеля гена CYP2D6 приводило к замедлению метаболической инактивации доксорубина, что манифестировало не столько повышением противоопухолевой эффективности, сколько резким возрастанием частоты системных токсических реакций, включая глубокую миелосупрессию и транзиторные нарушения сердечного ритма. Интеграция данных о полиморфизмах детоксикационных систем и экспрессионном профиле опухоли позволила разработать прогностическую матрицу, способную с точностью до восьмидесяти семи процентов предсказывать индивидуальный профиль эффективности и безопасности планируемого лечения.

Заключение

В ходе проведенного комплексного клинико-молекулярного исследования были всесторонне систематизированы, детально описаны и научно верифицированы ключевые генетические маркеры, определяющие чувствительность и резистентность опухолевых тканей молочной железы к терапии антрациклиновыми антибиотиками. На основе интеграции данных полимеразной цепной реакции, секвенирования и иммуногистохимии доказано, что феномен множественной лекарственной устойчивости носит глубоко гетерогенный и мультифакторный характер, формируясь за счет одновременного включения механизмов ускоренного эффлюкса препаратов, изменения структуры белков-мишеней и блокады сигнальных путей программируемой клеточной гибели. Определение этих параметров до начала лечебных манипуляций представляет собой важнейший шаг на пути к реализации концепции персонализированной онкологии.

Главный вывод настоящей работы заключается в том, что рутинное внедрение молекулярного профилирования опухолевых биоптатов позволяет коренным образом модернизировать подходы к химиотерапии рака молочной железы, заместив стандартные протоколы индивидуально адаптированными программами. Высокий уровень экспрессии гена ABCB1 в сочетании со снижением транскрипции TOP2A может служить абсолютным молекулярным показателем для исключения антрациклинов из схемы неoadъювантного лечения ввиду заведомой неэффективности, что оберегает пациентку от нецелевой кардиотоксической нагрузки. Рациональное использование разработанной прогностической матрицы дает возможность оптимизировать распределение терапевтических ресурсов и существенно повысить показатели долгосрочной безрецидивной выживаемости за счет своевременного назначения альтернативных цитостатиков.

Дальнейшее развитие данной научно-исследовательской проблематики связано с изучением роли малых некодирующих рибонуклеиновых кислот в процессах посттранскрипционной регуляции экспрессии ABC-транспортёров, что позволит глубже понять механизмы пластичности опухолевых клеток под воздействием терапии. Особый клинический интерес представляет также разработка и валидация тест-систем для так называемой «жидкостной биопсии», основанной на выделении циркулирующей опухолевой дезоксирибонуклеиновой кислоты из плазмы крови. Это обеспечит возможность осуществлять перманентный малоинвазивный мониторинг молекулярной эволюции опухоли непосредственно в процессе лечения и моментально фиксировать появление резистентных клонов для оперативной коррекции терапевтической схемы.

Список литературы

1. Герштейн Е.С., Кушлинский Н.Е. Молекулярные маркеры в онкологии: от теории к практике. М.: Медицина, 2011. 360 с.

2. Ганцев Ш.Х. Онкология. Учебник для медицинских вузов. М.: Медицинское информационное агентство, 2006. 488 с.
3. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2012. 210 с.
4. Заридзе Д.Г. Канцерогенез. М.: Медицина, 2004. 576 с.
5. Имянитов Е.Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты. СПб.: Издательство СПбМАПО, 2007. 240 с.
6. Каприн А.Д., Старинский В.В. Состояние онкологической помощи населению России. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2015. 250 с.
7. Копнин Б.П. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: механизмы канцерогенеза и лекарственной устойчивости. М.: Биохимия, 2000. 195 с.
8. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. Скрининг и ранняя диагностика рака молочной железы. СПб.: Облик, 2008. 144 с.
9. Степанова Е.В., Личиницер М.Р. Молекулярные механизмы резистентности к химиотерапии. М.: Практическая медицина, 2009. 180 с.
10. Чиссов В.И., Дарьялова С.Л. Клинические рекомендации. Онкология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 720 с.

References

1. Gershtein E.S., Kushlinsky N.E. Molekulyarnye markery v onkologii: ot teorii k praktike [Molecular Markers in Oncology: From Theory to Practice]. Moscow, Meditsina, 2011. 360 p.
2. Gantsev Sh.Kh. Onkologiya. Uchebnik dlya meditsinskikh vuzov [Oncology. Textbook for Medical Universities]. Moscow, Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2006. 488 p.
3. Davydov M.I., Aksel E.M. Statistika zlokachestvennykh novoobrazovaniy v Rossii i stranakh SNG [Statistics of Malignant Neoplasms in Russia and CIS Countries]. Moscow, N.N. Blokhin RCRC RAMS Publ., 2012. 210 p.
4. Zaridze D.G. Kantserogenez [Carcinogenesis]. Moscow, Meditsina, 2004. 576 p.
5. Imyanitov E.N. Molekulyarnaya onkologiya: klinicheskie aspekty [Molecular Oncology: Clinical Aspects]. St. Petersburg, St. Petersburg MAPO Publ., 2007. 240 p.
6. Kaprin A.D., Starinsky V.V. Sostoyanie onkologicheskoy pomoshchi naseleniyu Rossii [The State of Cancer Care to the Population of Russia]. Moscow, P.A. Herzen MSROI Publ., 2015. 250 p.
7. Kopnin B.P. Misheni deystviya onkogenov i opukholevykh supressorov: mekhanizmy kantserogeneza i lekarstvennoy rezistentnosti [Targets of Oncogenes

and Tumor Suppressors: Mechanisms of Carcinogenesis and Drug Resistance]. Moscow, Biokhimiya, 2000. 195 p.

8. Semiglazov V.F., Semiglazov V.V. Skrining i rannaya diagnostika raka molochnoy zhelezy [Screening and Early Diagnosis of Breast Cancer]. St. Petersburg, Oblik, 2008. 144 p.
9. Stepanova E.V., Lichinitser M.R. Molekulyarnye mekhanizmy rezistentnosti k khimioterapii [Molecular Mechanisms of Resistance to Chemotherapy]. Moscow, Prakticheskaya meditsina, 2009. 180 p.
10. Chissov V.I., Daryalova S.L. Klinicheskie rekomendatsii. Onkologiya [Clinical Guidelines. Oncology]. Moscow, GEOTAR-Media, 2008. 720 p.