

АНТИАНДРОГЕННАЯ ТЕРАПИЯ: НОВОЕ НАПРАВЛЕНИЕ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ?

Шатова Ю.С.¹, Франциянц Е.М.¹, Новикова И.А.¹, Токмаков В.В.¹, Ващенко Л.Н.¹, Бакулина С.М.¹, Андрейко Е.А.¹, Кит О.И.¹

¹ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ, Ростов-на-Дону, e-mail: shat5@rambler.ru

Проведен анализ локального гормонального фона опухоли, перифокальной зоны, гормонального рецепторного статуса у 285 больных различными биологическими подтипами РМЖ и репродуктивным статусом. Выявлена общая тенденция к увеличению количества положительных случаев экспрессии рецепторов андрогенов (РА) с возрастом. Исключением является тройной негативный рак (ТНР), при котором уровень экспрессии РА в опухоли при постменопаузе достоверно ниже, чем таковой при перименопаузе. При этом показатели гормонального гомеостаза в опухолях этих подгрупп идентичны. В репродуктивной группе и в перименопаузальный период гормональный фон опухоли характеризуется превалированием андрогенов над эстрогенами, а в постменопаузе зависит от биологического подтипа РМЖ. Только в репродуктивном периоде локальная гиперандрогения сочетается с низким уровнем экспрессии РА. Тот факт, что клетки ряда опухолей, негативных по рецепторам эстрогена (РЭ) и рецепторам прогестерона (РП), оказались во многих случаях позитивными по экспрессии РА, на наш взгляд, действительно является поводом рассматривать РА в качестве «мишени» для их лекарственной терапии. Однако рассматривать этот показатель следует в сочетании с другими биологическими характеристиками опухоли, в частности учитывая особенности локального гормонального фона у больных с различным репродуктивным статусом.

Ключевые слова: рак молочной железы, локальный гормональный статус опухоли, рецепторы андрогенов, антиандрогенная терапия

ANTIANDROGEN THERAPY: A NEW DIRECTION IN TARGETED THERAPY FOR BREAST CANCER?

Shatova Yu.S.¹, Frantsiyants E.M.¹, Novikova I.A.¹, Tokmakov V.V.¹, Vashchenko L.N.¹, Bakulina S.M.¹, Andreyko E.A.¹, Kit O.I.¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Rostov, e-mail: shat5@rambler.ru

The analysis of local hormones of the tumor, perifocal zone, hormone-receptor status was performed among 285 patients with various biological subtypes of breast cancer and reproductive status. The general trend of the number of positive cases of expression of androgen receptor (RA) increase with age is preserved. The exception to this is triple negative cancer (TNR), wherein the level of expression of RA in breast cancer in the postmenopausal women was significantly lower than that in perimenopausal women. In the reproductive group and premenopausally hormonal breast tumor characterized by a predominance of androgens over estrogens in postmenopausal women depends on the biological subtype of breast cancer. Only in the reproductive period local hyperandrogenism combined with a low level of expression of the androgen receptor. The fact that the cells of some tumors negative for ER and PR, were in many cases positive for the expression of RA, in our opinion, is indeed a reason to consider RA as a "target" for drug therapy. However, consider this figure should be combined with other biological characteristics of the tumor, in particular given the peculiarities of local hormonal levels in patients with different reproductive status.

Keywords: breast cancer, local hormonal status of the tumor, androgen receptor, antiandrogen therapy

На сегодняшний день рак молочной железы (РМЖ) рассматривается как системное гетерогенное заболевание, течение и прогноз которого зависят, прежде всего, от молекулярно-биологических характеристик опухоли [12]. Современные высокотехнологичные исследования подтверждают концепцию В. Fisher о возможности диссеминации даже ранних форм РМЖ, что и определяет особую роль лекарственной терапии в составе комплексного лечения данной болезни [1]. Схожие изменения локального

гормонального статуса практически при всех подтипах РМЖ доказывают исключительную значимость стероидных гормонов в патогенезе данного заболевания [2]. Определение экспрессии рецепторов эстрогена (РЭ) и прогестерона (РП) – один из ключевых моментов разделения опухолей молочной железы на биологические подтипы и является крайне важным фактором для выбора оптимальной системной терапии [13]. Возможность прицельного воздействия на некоторые элементы сигнального пути канцерогенеза принято обозначать термином «таргетная терапия», в том числе и на рецепторы стероидных гормонов. Роль андрогенов в развитии РМЖ до конца не определена и достаточно противоречива, что обуславливает возрастающий интерес исследователей и клиницистов к их изучению [7]. Лечение андрогенами в практической онкологии применяется с шестидесятых годов XX века и используется при метастатическом РМЖ в качестве последней линии гормонотерапии [5]. Были попытки использовать и антиандрогены (флутамид) для лечения генерализованных форм РМЖ, однако они не увенчались успехом, и потенциал данного вида эндокринотерапии был поставлен под сомнение [11]. Несмотря на обескураживающие предшествующие исследования применения антагонистов андрогенов в лечении РМЖ, появление новых андрогенных блокаторов для терапии рака предстательной железы и детальное изучение подтипов РМЖ вновь вернули интерес к этой проблеме [6]. Антиандрогенная терапия представляется особенно перспективной там, где отсутствуют другие терапевтические мишени, например при развитии резистентности к антиэстрогенной терапии или в лечении тройного негативного РМЖ [10]. Так, в настоящее время активно изучается возможность применения бикалутамида и других андрогенных антагонистов у пациенток с тройным негативным фенотипом опухоли и наличием экспрессии рецепторов андрогенов [8; 9]. Кроме этого, определение экспрессии рецепторов андрогенов (РА) может служить дополнительным прогностическим фактором. Выраженная экспрессия РА сопряжена с низким риском рецидива при всех подтипах РМЖ, а в сочетании с экспрессией рецепторов эстрогенов является предиктором лучшей общей выживаемости [15]. Таким образом, на наш взгляд, абсолютно закономерен вопрос: имеются ли действительно в ткани опухоли предпосылки для антиандрогенной терапии?

Цель исследования: изучить локальный гормональный фон опухоли, перифокальной зоны, а также гормонального рецепторного статуса у больных различными биологическими подтипами РМЖ и репродуктивным статусом.

Материалы и методы. Для исследования были отобраны 285 больных различными биологическими подтипами РМЖ и репродуктивным статусом. До забора материала больные не получали специфического лечения. Все пациентки до начала обследования дали свое письменное согласие на использование их персональных данных и биологического

материала для научно-исследовательских целей. Проведенное исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «РНИОИ» Минздрава РФ. Репродуктивный период женщины определялся нами согласно менструальному статусу [3]. Возраст больных в постменопаузе был 65–70 лет, в перименопаузе составил 49–50 лет, и больных репродуктивной группы – 40 лет. В исследование вошли пациентки с различными гистологическими формами РМЖ. Распределение больных по биологическим подтипам осуществлялось на основании рекомендаций Панели экспертов St. Gallen (2013) (рисунок).



Характеристика клинического материала

Учитывая, что неоднородность люминального В РМЖ определяется не только HER2neu статусом, но и другими немаловажными параметрами, такими как, например, индекс пролиферативной активности опухоли, а критерии его оценки постоянно пересматриваются, в данной работе мы решили рассматривать данный подтип в целом, не разделяя его на HER2neu+ и HER2neu- варианты. На наш взгляд, люминальный В подтип нуждается в пристальном изучении и заслуживает отдельного исследования.

Уровень эстрадиола, эстрогена и тестостерона определяли в 10%-ных цитозольных фракциях тканей молочной железы, приготовленных на 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 7,4, содержащем 0,1% Твин-20 и 1% БСА, стандартными ИФА-методами (наборы ХЕМА, «Биохиммак», «АлкорБио» Россия; DBC Канада). Все исследования у больных репродуктивной группы проводили на 2-ю фазу менструального цикла. В качестве интактной использовали ткань молочной железы (n=16), полученную во время операций по

поводу редукции молочных желез. Стандартной морфологической и иммуногистохимической (ИГХ) оценке подвергался операционный или биопсийный материал всех больных. Используемые в работе первичные антитела и их разведения представлены в табл. 1.

Таблица 1

Панель использованных для ИГХ антител

Специфичность	Клон	Фирма	Разведение	Буфер для «демаскировки антигенов»
Рецепторы прогестерона	PgR636, RTU, мышинные	DAKO		
Рецепторы эстрогенов	1D5, RTU, мышинные	DAKO		
c-erbB-2	Поликлональные	DAKO	1:500	
Ki67	MIB-1, RTU, мышинные	DAKO		
Androgen receptor	AR 441	DAKO	1:100	10 мМTris, 1 мМEDTA (pH 9,0)

Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по стандартной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-LinkThermo. Протокол включал в себя предварительный нагрев до 65 °С, восстановление антигена в течение 20 мин. при температуре 97 °С и дальнейшее охлаждение до 65 °С. Затем стекла промывали в течение 1–3 мин. TBS-буфером (Dako) и окрашивали в автоматическом режиме в автостейнере Thermo Scientific. Для визуализации ИГХ-реакции использовали систему детекции RevealPolyvalent HRP-DAB Detection System. Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа Leica (Германия) под увеличением x10, x20, x40. Для оценки уровня экспрессии рецепторов андрогенов оценивали количество опухолевых клеток, положительных по ядерной экспрессии данных маркеров, подсчитывали количество окрашенных ядер на 100 ядер в 3 полях зрения. Обработка полученных данных выполнялась с использованием пакета программ Statistica 7.0 и MedCalc (версия 9.3.5.0). Применялся дисперсионный анализ, критерий χ^2 . Обсуждаются результаты с достоверностью различий при $p < 0,05$ и с тенденцией различий при $p < 0,1$.

Результаты и обсуждение

Чувствительность опухолевых клеток к регуляторному воздействию гормонов также может оказывать влияние на тип ее биологического поведения. Действительно, при изучении гормонального рецепторного статуса опухолей при различных биологических подтипах

РМЖ и репродуктивном статусе мы выявили принципиальные различия. Экспрессия РА была максимальна при люминальных подтипах. Согласно полученным результатам анализа количества положительных случаев экспрессии РА по группам с учетом и биотипа опухоли, и репродуктивного статуса выявлена общая тенденция к ее увеличению с возрастом (табл. 2).

Таблица 2

Количество положительных случаев экспрессии РА в опухолях различных биологических подтипов у больных с разным репродуктивным статусом, абс. ч. (%)

Биологический подтип	Репродуктивный статус больных		
	репродуктивный	перименопауза	постменопауза
Люминальный А (n=78)	18 (85,7) [*] (n=21)	21 (100,0) (n=21)	36 (100,0) ² (n=36)
Люминальный В (n=99)	18 (75,0) [*] (n=24)	18 (100,0) [*] (n=18)	54 (94,7) [*] (n=57)
HER2-neu+ (n=45)	12 (8,0) [*] (n=15)	9 (10,0) [*] (n=9)	21 (100,0) ^{2*} (n=21)
ТНР (n=63)	9 (5,0) ¹ (n=18)	15 (10,0) ^{*1} (n=15)	24 (80,0) [*] (n=30)

Примечание. Различия достоверны ($p < 0,05$) в отношении: * – репродуктивной группы; ¹ – постменопаузы; ² – ТНР в постменопаузе; ^{*} – репродуктивной группы ТНР

Можно предположить, что по мере угасания репродуктивной и менструальной функции происходит снижение экспрессии РЭ и РП, а экспрессия РА возрастает. Это, в свою очередь, может объяснять особенности стероидогенеза у больных РМЖ в постменопаузе. Однако частота экспрессии РА, по нашим данным, превосходит литературные [14]. Исключением является ТНР, при котором уровень экспрессии РА в опухоли при постменопаузе достоверно ниже, чем таковой при перименопаузе. При этом показатели гормонального гомеостаза в опухолях этих подгрупп идентичны. Тот факт, что клетки ряда опухолей, негативных по РЭ и РП, оказались во многих случаях позитивными по экспрессии РА, на наш взгляд, действительно является поводом рассматривать РА в качестве «мишени» для их лекарственной терапии.

Уже из описания характеристик подтипов РМЖ видно насколько большое влияние на возникновение и развитие злокачественной опухоли, а также способы лечения и прогноз исхода заболевания оказывает насыщенность тканей молочной железы гормонами. Поэтому логичным являлось проанализировать соотношение уровня экспрессии половых гормонов и уровня самих половых гормонов в опухоли и перифокальной зоне. Как ни парадоксально, по нашим данным, у больных люминальными подтипами РМЖ только в постменопаузе была отмечена локальная гиперэстрогения. Причем при люминальном А РМЖ как за счет повышения уровня эстрадиола (Е2) в 1,9 раза в опухоли и в 1,7 раза в перифокальной зоне, так и за счет увеличения эстрона (Е1) в 1,6 раза в опухоли и в 1,8 раза в перифокальной зоне.

Вероятно, образование эстрогенов происходило непосредственно в тканях молочной железы, так как одновременно было выявлено снижение концентрации предшественника эстрогенов тестостерона в 1,5 раза. Противоположная картина наблюдалась у больных этим же биотипом РМЖ, но с сохранной или относительно сохранной функцией яичников. Коэффициент соотношения $E1+E2/T$ у этих больных был в 1,3–2 раза ниже, чем в интактной ткани. Аналогичную картину локального гормонального статуса мы наблюдали в постменопаузе, но у больных ТНР. У больных люминальным В РМЖ содержание половых гормонов в опухоли было схожим, но уровень эстрогена более чем в 2 раза превышал таковой в опухоли люминального А РМЖ. Соответственно отмечено и снижение $E2/E1$ в 2,5 раза.

Интересным фактом, на наш взгляд, явилось то, что в условиях отсутствия в опухолевой ткани РЭ и РП у больных в постменопаузе при HER2neu+ РМЖ отмечается факт роста в 1,6 раза концентрации эстрадиола и в 1,9 раза эстрогена в опухолевой ткани и обеднение гормонами перифокальной зоны с концентрацией их в опухоли. При этом ранее полученные нами данные предполагают своеобразный механизм «перекачки» их из перифокальной зоны в опухоль. Наряду с этим не приходится говорить о повышенном метаболизме эстрогенов перифокальной зоной, так как уровень как 2ОНЕ снижался, а 16ОНЕ – не изменялся [4]. У больных HER2neu+ РМЖ в перименопаузе и в репродуктивной группе нарушения были не специфичны. Видимо, особенности гормонального гомеостаза HER2neu+ РМЖ, а не наличие экспрессии РП и РЭ объясняют относительно высокий уровень экспрессии РА. Это предположение свидетельствует о том, что необходимо проводить дальнейшее изучение закономерностей содержания половых гормонов с учетом рецепторного статуса опухоли.

Несмотря на общие черты нелюминальных подтипов, ТНР отличается своеобразной картиной локального гормонального статуса опухоли и перифокальной зоны, отличной от HER2neu+ РМЖ. Как уже упоминалось, у больных в постменопаузе только при ТНР отмечена относительная гиперандрогения в опухоли ($E2+E1/T$ был в 2 раза ниже показателей в интактной ткани). А у больных репродуктивной группы и в перименопаузе было зафиксировано отсутствие разницы эстрогенного метаболизма в опухоли и перифокальной зоне, что свидетельствует об исчезновении «метаболических границ» и может объяснять более агрессивное течение заболевания.

Таким образом, можно предположить, что репродуктивный статус больных оказывает определенное влияние на гормональный фон различных биологических подтипов РМЖ. В настоящем исследовании абсолютная и относительная гиперэстрогения в тканях молочной железы была выявлена только у больных с люминальными типами РМЖ в постменопаузе. В остальных случаях опухолевая ткань и окружающая ее зона хотя и

отличались повышенным уровнем эстрогена, но при рассмотрении соотношения суммы эстрогенов к тестостерону демонстрировали превалирование андрогенов. Удивительным является то, что относительная гиперандрогения тканей молочной железы у больных репродуктивной группы и больных в перименопаузе была характерна не только для нелюминальных (что было характерно и для ТНРМЖ у больных в постменопаузе), но и для люминальных А и В подтипов, в тканях которых выявлено наличие рецепторов половых гормонов. Сопоставление локального гормонального фона опухоли и уровня экспрессии рецепторов половых гормонов показало, что только в репродуктивном периоде локальная гиперандрогения вне зависимости от биологического подтипа опухоли сочеталась с низким уровнем экспрессии рецепторов андрогенов. По мере угасания репродуктивной функции уровень экспрессии рецепторов андрогенов возрастал, и уже в перименопаузе относительная гиперандрогения в опухоли сочеталась с их высоким уровнем экспрессии.

Выводы

Проведенное исследование выявило несомненные фундаментальные предпосылки для рассмотрения уровня экспрессии РА в качестве потенциальной «мишени» для таргетной терапии РМЖ. В первую очередь, целесообразно рассмотреть возможность ее применения у больных ТНР с наличием экспрессии РА, поскольку при этом подтипе, даже у больных в постменопаузе, отмечена в ткани опухоли относительная гиперандрогения, что кардинально отличает этих пациенток от других, находящихся в постменопаузе. Несомненно, что рассматривать такой показатель, как уровень экспрессии РА, следует в сочетании с другими биологическими характеристиками опухоли, в частности учитывая особенности локального гормонального фона у больных с различным репродуктивным статусом. Нельзя исключить, что непосредственная клиническая эффективность антиандрогенных препаратов будет зависеть не только от уровня экспрессии половых гормонов, но и от локального содержания половых гормонов в опухоли, а возможно и в перифокальной зоне. Учитывая, что на сегодняшний день мы имеем больше вопросов, чем ответов, необходимы дальнейшие исследования в этой области, что, как хочется надеяться, позволит пополнить арсенал таргетной терапии РМЖ.

Список литературы

1. Кит О.И., Новикова И.А., Бахтин А.В. и др. Первый опыт детекции циркулирующих опухолевых клеток в периферической крови // Международный журнал экспериментального образования. – 2013. – № 11-2. – С. 37-39.
2. Кит О.И., Франциянц Е.М., Бандовкина В.А. и др. Уровень половых гормонов и

пролактина в ткани злокачественных опухолей молочной железы у больных разного возраста // *Фундаментальные исследования*. – 2013. – № 7-3. – С. 560-564.

3. Сметник В.П. Неоперативная гинекология / В.П. Сметник, Л.Г. Тумилович. – СПб.: Сотис, 1995. – С. 221.
4. Шатова Ю.С., Франциянц Е.М., Новикова И.А. и др. Локальный гормональный фон опухоли и перифокальной зоны у больных раком молочной железы: данные и перспективы их применения // *Опухоли женской репродуктивной системы*. – 2016. – № 12 (3). – С. 30-35. DOI:10.17650/1994-4098-2016-12-3-30-35.
5. Birrell S.N., Hall R.E., Tilley W.D. Role of the androgen receptor in human breast cancer // *J. Mammary Gland BiolNeoplasia* – 1998. January 1. – 3 (1). – P. 95-103.
6. Chia K., O'Brien M., Brown M., Lim E. Targeting the androgen receptor in breast cancer // *CurrOncol Rep*. – 2015. February 1. – 17 (2). – P. 4.
7. Dimitrakakis C. Androgens and Breast Cancer in Men and Women // *Endocrinology and Metabolism Clinics*. – 2011. – Vol. 40. – № 3. – P. 533-547.
8. Fioretti F.M., Sita-Lumsden A., Bevan C.L., Brooke G.N. Revising the role of the androgen receptor in breast cancer // *J. Mol. Endocrinol*. – 2014. June 1. – 52 (3). – P. R257-65.
9. Gucalp A., Traina T.A. Targeting the androgen receptor in triple- negative breast cancer // *Current Problems in Cancer*. – 2016-03-01. – Vol. 40, № 2. – P. 141-150.
10. McNamara K.M., Sasano H. Androgen and breast cancer: an update // *CurrOpinEndocrinol Diabetes Obes*. – 2016. June 1. – 23 (3). – P. 249-56.
11. Perrault D.J., Logan D.M., Stewart D.J. et al. Phase II study of flutamide in patients with metastatic breast cancer. A National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group study // *Invest New Drugs* – 1988. September 1. – 6 (3). – P. 207-10.
12. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer // *J. Clin. Invest*. – 2011. – October 1. – 121 (10). – P. 3786-8.
13. Sonnenblick A., Fumagalli D., Sotiriou C., Piccart M. Is the differentiation into molecular subtypes of breast cancer important for staging, local and systemic therapy, and follow up? // *Cancer Treatment Reviews*. – 2014. – Vol. 40, № 9. – P. 1089-1095.
14. Thike A.A. Loss of androgen receptor expression predicts early recurrence in triple-negative and basal-like breast cancer / A.A. Thike, L. Yong-ZhengChong, P.Y. Cheok et al. // *Mod. Pathol*. – 2014. Mar. – 27 (3). – P. 352–60.
15. Qu Q., Mao Y., Fei X.C., Shen K.W. The impact of androgen receptor expression on breast cancer survival: a retrospective study and meta-analysis // *PLoS ONE*. – 2013. January 1. – 8 (12). – P. e82650.