

## ЦИКЛИН D1 КАК ПРЕДИКТОР И ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Ващенко Л.Н.<sup>1</sup>, Кварчия М.В.<sup>1</sup>, Карнаухов Н.С.<sup>1</sup>, Гудцкова Т.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения России, Ростов-на-Дону, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

На материале 60 пациенток с подтвержденным тройным негативным раком молочной железы (ТН РМЖ), находившихся на лечении в ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ с 2012 по 2015 гг., изучена связь бессобытийной выживаемости с уровнем экспрессии Циклина D1 в базальноподобных и небазальноподобных ТН РМЖ. Все пациентки были клинической стадии 2A (T2N0M0/T1N1M0), прошедшие лечение: операция, затем лучевая терапия и химиотерапия по схеме FAC и AC. Средний возраст составил 51,3±3,5 года, возраст большинства женщин (66,7%) приходился на промежуток от 41 до 60 лет. Иммуногистохимическим методом на парафиновых срезах операционного материала определяли базальноподобный подтип ТН РМЖ и уровень экспрессии Циклина D1. Были использованы антитела к цитокератинам 5/6, EGFR и Циклину D1. Выявлено методами Каплан-Мейера и Кокса, что статистически значимо ( $p=0,018$ ) выживаемость больных была наименьшей при ТН РМЖ с базальными характеристиками и гиперэкспрессией Циклина D1 в опухоли, а также, что от количественного показателя, отражающего выраженность экспрессии Циклина D1, статистически значимо ( $p=0,008$ ) зависят временные параметры бессобытийной выживаемости.

Ключевые слова: тройной негативный рак молочной железы, базальноподобный подтип, Циклин D1, бессобытийная выживаемость, предикторный фактор

## CYCLIN D1 AS A PREDICTOR AND POTENTIAL TARGET FOR THE TREATMENT OF TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

Vashchenko L.N.<sup>1</sup>, Kvarchiya M.V.<sup>1</sup>, Karnaukhov N.S.<sup>1</sup>, Gudtskova T.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, e-mail: onko-sekretar@mail.ru

On the material of 60 patients with confirmed triple negative breast cancer (TNBC), were treated in the Rostov Research Institute of Oncology from 2012 to 2015. The association of event-free survival with the expression level of Cyclin D1 in basal-like and non-basal-like TNBC was studied. All patients were of clinical stage 2A (T2N0M0/T1N1M0), undergoing treatment: surgery, followed by radiation therapy and chemotherapy according to the FAC and AC scheme. The average age was 51,3±3,5 years, the majority of women (66,7%) were in the range from 41 to 60 years. An immunohistochemical method on paraffin sections of the surgical material was used to determine the basal-like subtype of TNBC and the expression level of Cyclin D1. Antibodies to cytokeratin 5/6, EGFR and Cyclin D1 were used. The methods of Kaplan-Meier and Cox were revealed, which is statistically significant ( $p=0,018$ ), the survival of patients was the lowest for TNBC with basal characteristics and overexpression of cyclin D1 in the tumor, as well ( $p=0,008$ ) the time parameters of event-free survival depend.

Keywords: triple negative breast cancer, basal-like subtype, Cyclin D1, event-free survival, predictor factor

Рак молочной железы (РМЖ) в структуре онкологической заболеваемости женщин занимает 1-е место. Заболеваемость РМЖ с каждым годом неуклонно растет на 1–2%, ежегодно в мире регистрируют более 1 млн новых случаев [1]. В настоящее время установлено, что РМЖ является гетерогенным заболеванием, поэтому успехи лечения и прогноза РМЖ напрямую зависят от правильной и своевременной морфологической, иммуногистохимической, молекулярно-генетической диагностики данного заболевания. В то время как таргетные методы лечения доступны для пациентов с РМЖ, у которых опухоли экспрессируют эстрогеновые и прогестероновые рецепторы или имеется гиперэкспрессия

онкобелка HER-2/neu, для тройного негативного (ТН) РМЖ такого лечения не существует. ТН РМЖ составляет от 10 до 20% всех опухолей молочной железы, эти раки традиционно связывают с более плохим прогнозом течения заболевания, однако некоторые больные показывают повышенный риск смерти в течение первых 5 лет, а другие выживают в течение более 10 лет после постановки диагноза. Поиск предикторных факторов и мишеней для терапии этого подтипа РМЖ остается актуальным.

Биомаркеры клеточного цикла, в частности Циклины, ассоциированные с ними циклин-зависимые киназы и циклин-зависимые ингибиторы киназ играют важнейшую роль в развитии клеточного цикла. При опухолях различного генеза установлено, что повышенная продукция Циклина D1 способствует инициации клеточного деления, коррелирует с большей частотой метастазирования опухолей и худшей выживаемостью больных [2, 3].

Данные об уровне экспрессии Циклина D1 и его прогностическом значении в лечении РМЖ остаются противоречивыми. Часть исследований показали, что избыточная экспрессия Циклина D1 является хорошим прогностическим фактором, особенно для эстроген-позитивных пациентов, в некоторых условиях Циклин D1 может вызывать остановку роста вместо прогрессирования клеточного цикла [4, 5]. Однако другие авторы сообщают, что избыточная экспрессия Циклина D1 является предиктором плохого прогноза, Циклин D1 способствует фосфорилированию белка ретинобластомы и других субстратов путем связывания с циклин-зависимой киназой 4/6 (CDK4/6), что способствует быстрому размножению клеток [6, 7].

Цель исследования: Оценить связь уровня экспрессии Циклина D1 в ТН РМЖ с бессобытийной выживаемостью больных с учетом подтипа опухоли – с наличием признаков базального эпителия или их отсутствием.

**Материалы и методы исследования.** В исследование включены 60 пациенток с подтвержденным ТН РМЖ в клинической стадии 2А (T2N0M0/T1N1M0), находившихся на лечении в ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» МЗ РФ с 2012 по 2015 гг. Во всех случаях операция являлась первым этапом лечения, затем пациентки получали лучевую терапию и химиотерапию по схеме FAC и AC. Возраст пациенток колебался от 29 лет до 71 года, средний возраст составил  $51,3 \pm 3,5$  года, возраст большинства женщин (66,7%) приходился на промежуток от 41 до 60 лет.

Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на парафиновых срезах операционного материала. Для выделения группы базальноподобных (БП) раков использовали ИГХ маркеры к цитокератинам 5/6 (CK5/6) и эпидермальному фактору роста 1-го типа (EGFR). БП ТН РМЖ считали раки, в клетках которых наблюдалась экспрессия CK5/6 (более 10% клеток) и/или EGFR (любое окрашивание), остальные отнесли к

неклассифицированным (НК) ТН РМЖ. Чувствительность данного метода определения базальноподобных характеристик составляет 80% и 100% специфичности для базальноподобного подтипа [8]. Для характеристики экспрессии Циклина D1 вычисляли долю клеток с окрашенными ядрами в процентах от общего количества опухолевых клеток. Подсчет проводили полуколичественным методом не менее чем в 10 случайных полях зрения при увеличении x200. ИГХ-окрашивание проводили в иммуногистостейнере BenchMark ULTRA Ventana с антителами к Циклин D1 (клон EP12) Dako, 1:200; СК 5/6 (клон D5/6BH) Dako, 1:200; EGFR (клон E30) Dako, 1:50. Для статистического анализа результатов исследования использовали компьютерную программу STATISTICA 12.0 (StatSoft, США).

**Результаты исследования и их обсуждение.** На сегодняшний день многочисленные попытки выделения подтипов среди тройных негативных раков молочной железы привели к устойчивому выделению лишь его базальноподобного подтипа, поэтому в нашем исследовании мы ограничились выделением именно этого подтипа. На основании результатов ИГХ-исследования с антителами к СК5/6 и EGFR все ТН РМЖ распределились следующим образом: базальные характеристики были выявлены в 37 (61,7%) опухолях (БП ТН РМЖ) и отсутствовали в 23 (38,3%), последние мы отнесли к неклассифицированным (НК) ТН РМЖ (табл. 1).

Таблица 1

Распределение ТН РМЖ в зависимости от подтипа и уровня экспрессии Циклина D1

Подтип ТН РМЖ абс. (%)		Уровень Циклина D1	абс. (%)
Всего: 60 (100)	Базальноподобный 37 (61,7)	высокий	12 (32,4)
		низкий	25 (67,6)
		Всего: 37 (100)	
	Неклассифицированный 23 (38,3)	высокий	10 (43,5)
		низкий	13 (56,5)
		Всего: 23 (100)	

Известно, что ТН РМЖ, как правило, характеризуются высоким уровнем маркера пролиферации Ki-67. Ранее мы установили, что в исследованных опухолях при общем высоком уровне и относительной однородности показателей Ki-67 ( $76,4 \pm 2,2\%$ ) экспрессия другого маркера клеточного цикла – Циклина D1 – сильно варьировала (от 1 до 100% популяции опухолевых клеток). Среднее значение этого показателя в БП ТН РМЖ было достоверно выше по сравнению с НК ТН РМЖ ( $89,9 \pm 4,7\%$  и  $66,5 \pm 6,6\%$  соответственно,

$p \leq 0,05$ ) [9]. За пороговое значение Циклина D1 мы приняли 30%, поскольку в исследованных опухолях доля окрашенных клеток находилась либо в интервале от 1 до 30%, либо от 50 до 100%, также подобную градацию встречали у других исследователей [10].

Высокий уровень Циклина D1 (>30% клеток) в обоих подтипах встречался реже, чем низкий: в БП ТН РМЖ – в 32,4% наблюдений, в НК ТН РМЖ – в 43,5% (табл. 1).

У больных с НК ТН РМЖ экспрессия Циклина D1 в опухолевой ткани не сказывалась на бессобытийной выживаемости (рис. 1). По Log-Rank тесту различие между кривыми Каплана-Мейера было недостоверным ( $p=0,32$ ). У больных с НК ТН РМЖ и высокой экспрессией Циклина D1 выживаемость снижалась со 100% до 60%, а у пациенток с НК ТН РМЖ и низкой экспрессией Циклина D1 в опухолевой ткани – со 100 до 71,4% (табл. 2).

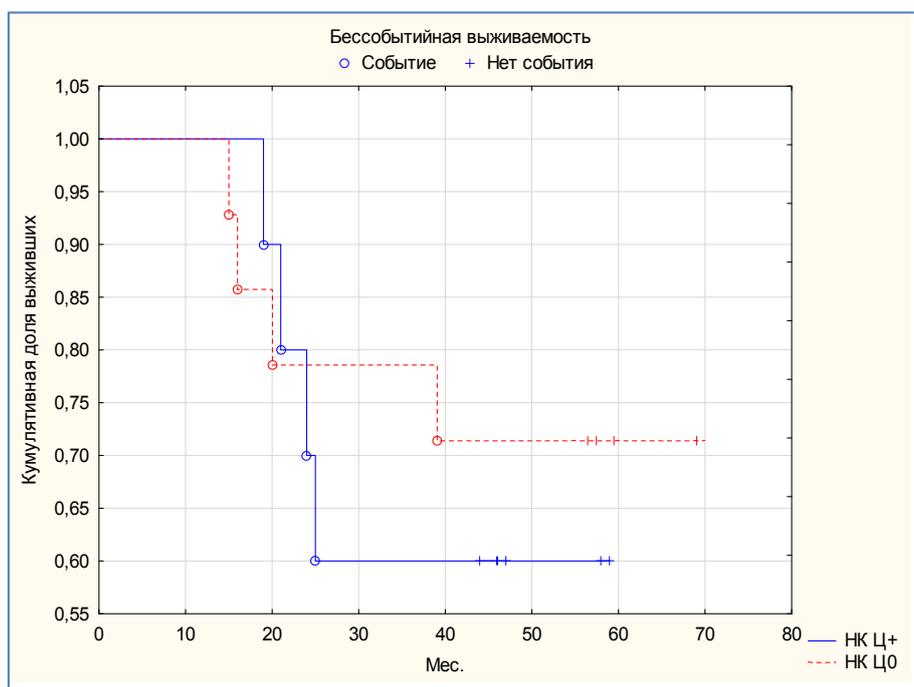


Рис. 1. Кривые Каплана-Мейера бессобытийной выживаемости больных с НК ТН РМЖ и учетом экспрессии Циклина D1. НК Ц+ – экспрессия Циклина D1 высокая, Ц0 – экспрессия Циклина D1 низкая,  $p=0,32$

Экспрессия Циклина D1 БП ТН РМЖ в опухолевой ткани, напротив, статистически значимо ( $p=0,018$ ) отразилась на бессобытийной выживаемости больных (рис. 2). По Log-Rank тесту различие между кривыми Каплана-Мейера было достоверным ( $p=0,018$ ). У больных с БП ТН РМЖ и высокой экспрессией Циклина D1 выживаемость снижалась со 100% до 42,9%, в то время как у пациенток с БП ТН РМЖ с низкой экспрессией Циклина D1 в опухолевой ткани – со 100% до 93,75% (табл. 3).

Динамика кумулятивной доли бессобытийной выживаемости больных с НК ТН РМЖ с учетом экспрессии Циклина D1 в опухолевой ткани

Период после операции, месяцев	Уровень экспрессии Циклина D1 в НК ТН РМЖ	
	высокий	низкий
15,0	100,0	100
21,1	80,0	78,6
27,2	60,0	78,6
33,3	60,0	78,6
39,4	60,0	71,4
45,6	60,0	71,4
51,7	60,0	71,4
57,8	60,0	71,4
63,9	60,0	71,4 </td
70,0	60,0	71,4

Таким образом, в нашем исследовании удалось установить, что в группе больных с ТН РМЖ, имевших базальноподобные характеристики (CK5/6+ и/или EGFR+), наличие высокого уровня экспрессии Циклина D1 (>30%) статистически достоверно сказывалось на выживаемости больных, она была наименьшей. В небазальноподобных раках уровень экспрессии Циклина D1 достоверно не влиял на показатели бессобытийной выживаемости больных.

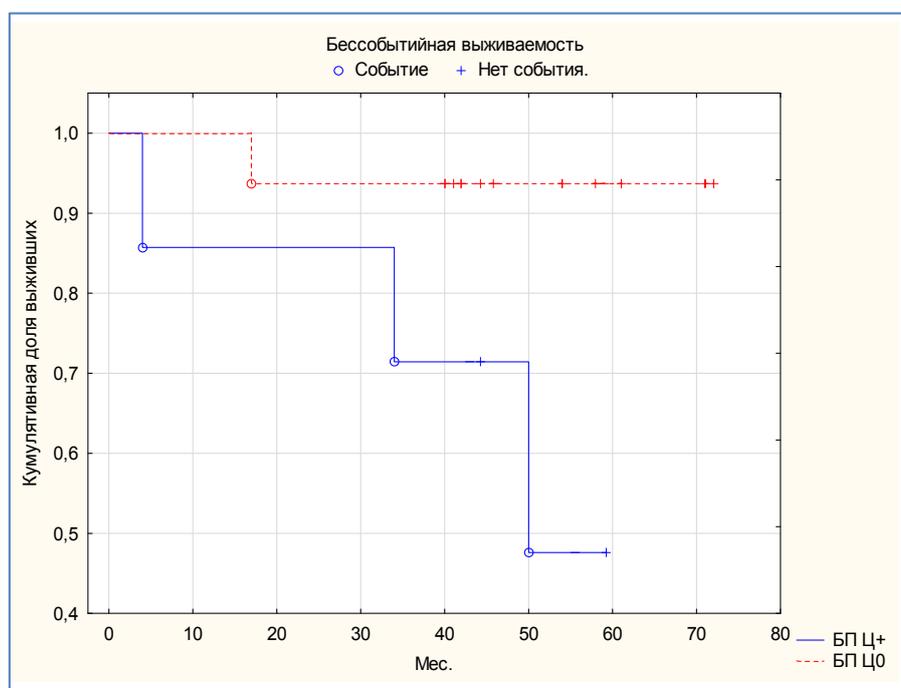


Рис. 2. Кривые Каплана-Мейера бессобытийной выживаемости больных с БП ТН РМЖ и учетом экспрессии Циклина D1. Ц+ – экспрессия Циклина D1 высокая, Ц0 – экспрессия Циклина D1 низкая,  $p=0,018$

Динамика кумулятивной доли бессобытийной выживаемости больных с БП ТН РМЖ с учетом экспрессии Циклина D1 в опухолевой ткани

Период после операции, месяцев	Уровень экспрессии Циклина D1 в БП ТН РМЖ	
	высокий	низкий
4,0	100,0	100,0
11,6	85,7	100,0
19,1	85,7	93,8
26,7	85,7	93,8
34,2	71,4	93,8
41,8	71,4	93,8
49,3	71,4	93,8
56,9	42,9	93,8
64,4	42,9	93,8
72,0	42,9	93,8

Для оценки влияния количественных параметров экспрессии Циклина D1 на бессобытийную выживаемость был предпринят регрессионный анализ методом пропорциональных интенсивностей Кокса. В результате было установлено, что от количественного показателя, отражающего выраженность экспрессии Циклина D1 в опухолевой ткани, статистически значимо ( $p=0,008$ ) зависят временные параметры бессобытийной выживаемости. Стандартизированный коэффициент регрессии  $\beta$  составил  $1,143 \pm 0,008$ , что свидетельствовало о выраженной силе взаимосвязи между изучаемыми параметрами. Статистика Вальда имела высокое значение 3,72 и с достаточной вероятностью ( $p=0,008$ ) позволяла отвергнуть нулевую гипотезу о равенстве стандартизированного коэффициента нулю, что позволяло считать полученную информацию о влиянии фактора адекватной.

Гиперэкспрессия Циклина D1 приводит к дисрегуляции активности циклинзависимых киназ, быстрому росту клеток в условиях ограниченной митогенной передачи сигналов, обходу ключевых клеточных контрольных точек и в итоге к опухолевому росту. Недавно выявлена роль Циклина D1 в индукции клеточной миграции и инвазии, усилении ангиогенеза [11].

В эксперименте показано, что ингибирование циклин-зависимых киназ приводит к блокированию клеточного цикла. Определены субстанции, ингибирующие Циклин-зависимые киназы, и в настоящее время некоторые из них проходят клинические испытания [12].

Таким образом, определение уровня экспрессии Циклина D1 в ТН РМЖ является

перспективным для использования его в качестве прогностического маркера, а также потенциальной мишени для таргетной терапии.

### **Выводы**

1. Наличие гиперэкспрессии Циклина D1 (>30%) в БП ТН РМЖ является фактором плохого прогноза в отношении бессобытийной выживаемости больных (по Log-Rank тесту различие между кривыми Каплана-Мейера было достоверным:  $p=0,018$ ).
2. Временные параметры бессобытийной выживаемости статистически значимо ( $p=0,008$ ) зависят от количественного показателя, отражающего выраженность экспрессии Циклина D1 в опухолевой ткани.
3. В ТН РМЖ без признаков базального эпителия экспрессия Циклина D1 в опухолевой ткани не сказывалась на бессобытийной выживаемости больных (по Log-Rank тесту различие между кривыми Каплана-Мейера было недостоверным:  $p=0,32$ ).

### **Список литературы**

1. Рассказова Е.А., Рожкова Н.И. Скрининг для ранней диагностики рака молочной железы // Исследования и практика в медицине. 2014. Т. 1. № 1. С. 45-51.
2. Горбань Н.А., Кудайбергенова А.Г., Панкратов В.А. Прогностическое значение маркеров пролиферативной активности и регуляции апоптоза при плоскоклеточном раке гортани // Архив патологии. 2013. № 1. С. 3-9.
3. Zhuo W., Zhang L., Wang Y., Zhu B., Chen Z. Cyclin D1 G870A polymorphism is a risk factor for esophageal cancer among Asians. *Cancer Invest.* 2012. Vol. 30. No 9. P.630-636. DOI: 10.3109/07357907.2012.726385.
4. Mylona E., Tzelepis K., Theohari I., Giannopoulou I., Papadimitriou C., Nakopoulou L. Cyclin D1 in invasive breast carcinoma: favourable prognostic significance in unselected patients and within subgroups with an aggressive phenotype. *Histopathology.* 2013. No 62. P. 472-480. DOI: 10.1111/his.12013 PMID:23163571.
5. Angela B. Ortiz, Diego Garcia, Yolanda Vicente, Magda Palka, Carmen Bellas, Paloma Martin Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. *PLOS ONE.* 2017. Vol.12 (11). DOI: 10.1371/journal.pone.0188068.
6. Li Z., Cui J., Yu Q. Li Z., Cui J., Yu Q., Wu X., Pan A., Li L. Evaluation of CCND1 amplification and CyclinD1 expression: diffuse and strong staining of CyclinD1 could have same predictive roles as CCND1 amplification in ER positive breast cancers. *Am. J. Transl. Res.* 2016. Vol. 8. P. 142-153.
7. Ahlin C., Lundgren C., Embretse'n-Varro E., Jirstro'm K., Blomqvist C., Fja'llskog M.L.

High expression of cyclin D1 is associated to high proliferation rate and increased risk of mortality in women with ER-positive but not ER-negative breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* 2017. Vol. 164. P. 667-678. DOI: 10.1007/s10549-017-4294-5 PMID: 28528450.

8. Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K., Jensen K., Cheang M., Karak G., Hu Z., Hernandez-Bussar T., Livasi S., Cowen D., Dressler L., Axlen L.A., Ragaz J., Goam A.M., Gilks K.B., van de Reine M., Peru C.M.. Information Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 2004. Vol. 10. No 16. P. 5367-5374.

9. Ващенко Л.Н., Карнаухов Н.С., Гудцкова Т.Н., Кварчия М.В. Сопоставление уровня экспрессии маркеров пролиферации Ki-67 и Циклина D1 в тройном негативном раке молочной железы с различным андрогеновым статусом // *Современные проблемы науки и образования.* 2018. № 4. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru> (дата обращения: 10.06.2019).

10. Скворцов В.А., Манихас Г.М. Циклин D1 и его прогностическая значимость в планировании эндокринной терапии у женщин постменопаузального возраста при раке молочной железы // *Врач-аспирант.* 2012. № 1.3 (50). С. 401-407.

11. Pestell R.G. New roles of Cyclin D1. *Am. J. Pathol.* 2013. Vol. 183. No 1. P. 3-9.

12. Shuo Qie, J. Alan Diehl Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer Treatment. *J. Mol. Med.* 2016. Vol. 94. P. 1313-1326. DOI: 10.1007/s00109-016-1475-3.