

EXPRESSE GENU MNOHOČETNÉ LÉKOVÉ REZISTENCE 1 (MDR1) A JEJÍ VÝZNAM V ROZVOJI A TERAPII KARCINOMU PRSU

EXPRESSION OF MULTIDRUG RESISTANCE GENE 1 (MDR1) AND ITS ASSOCIATION WITH DEVELOPMENT AND CLINICAL OUTCOME OF BREAST CARCINOMA

VÁCLAVÍKOVÁ R.¹, HUBÁČKOVÁ M.^{1,5}, KUBALA E.², KODET R.³, MRHALOVÁ M.³, NOVOTNÝ J.⁴, GUT L.¹ a SOUČEK P.¹

¹ STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, PRAHA

² RADIOTERAPEUTICKO-ONKOLOGICKÉ ODDĚLENÍ, FAKULTNÍ NEMOCNICE MOTOL, PRAHA

³ ÚSTAV PATOLOGIE A MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY 2.LF UK A FAKULTNÍ NEMOCNICE MOTOL, PRAHA

⁴ ONKOLOGICKÁ KLINIKA VFN A 1.LF UK, PRAHA

⁵ 3.LF UK

Souhrn

Východiska: Mnohočetná léková rezistence je významnou překážkou úspěšné léčby nádorových onemocnění. Jedním z nejvýznamnějších proteinů přispívajících k rozvoji rezistence je P-glykoprotein kódovaný genem mnohočetné lékové rezistence (*MDR1*, nově *ABCB1*). Vysoká exprese *MDR1* v primárních nádorech karcinomu prsu může být spojena se špatnou prognózou vývoje onemocnění a být negativním prediktivním faktorem výsledku chemoterapie. **Metody:** Metodou real-time PCR byly detekovány transkripty *MDR1* v nádorové tkáni souboru 88 pacientek s karcinomem prsu a současně v párových vzorcích nenádorové tkáně u 40 pacientek. Dále byly statisticky zhodnoceny rozdíly v expresi mezi skupinami pacientek rozdělenými podle klinicko-patologických charakteristik analýzou variance ANOVA. Pro analýzy vztahu genových expresí k celkovému a bezpříznakovému přežívání pacientek byl použit Kaplan-Meierův test. **Výsledky:** Exprese *MDR1* byla detekována u 87/88 (98,9 %) vzorků nádorové a 39/40 (97,5%) vzorků kontrolní tkáně 87 (98,9 %) pacientek. Exprese byla charakterizovaná velkou interindividuální variabilitou. K deregulaci exprese *MDR1* docházelo především v nádorové tkáni (89,7%). Korelace exprese *MDR1* s klinicko-patologickými údaji pacientek nebyla nalezena. Riziko relapsu u pacientek s vysokou expresí *MDR1* bylo významně vyšší v případech, že byly léčeny substráty P-glykoproteinu antracykliny nebo taxany ($P = 0,031$). **Závěr:** Exprese *MDR1* se jeví jako potenciální prediktivní faktor úspěšnosti chemoterapie karcinomu prsu režimy na bázi taxanů či antracyklinů.

Klíčová slova: karcinom prsu, *MDR1*, exprese, real-time PCR, léčba, predikce.

Summary

Background: Multiple drug resistance presents a major problem for successful cancer chemotherapy. One of the most important proteins contributing to the development of resistance is the P-glycoprotein encoded by multidrug resistance gene 1 (*MDR1*, newly *ABCB1*). A high expression of *MDR1* might correlate with shorter overall survival and worse chemotherapy outcome. **Methods:** mRNA levels of *MDR1* were analyzed in 88 breast tumor samples and in adjacent non-tumor tissue samples ($n = 40$) by real-time PCR. Statistical comparisons between the levels of *MDR1* expression and clinical-pathological data were performed using ANOVA test. Kaplan-Meier's statistics test was used for the estimation of significance of differences in overall and disease-free survivals. **Results:** *MDR1* was expressed in 87/88 (98,9 %) of tumors samples and in 39/40 (97,5%) of non-tumor breast samples. Striking inter-individual variability in expression of *MDR1* was found with down-regulation in almost 89,7% of all tumors. No correlation of *MDR1* expression with clinical-pathological characteristics was found. Patients with high *MDR1* expression treated with P-gp substrates anthracycline or taxane containing regimens had significantly shorter disease-free survival than those treated by other regimens ($P = 0,031$). **Conclusion:** *MDR1* expression seems appears to be a potential predictive factor of chemotherapy outcome in breast cancer patients treated with anthracycline or taxane containing regimens.

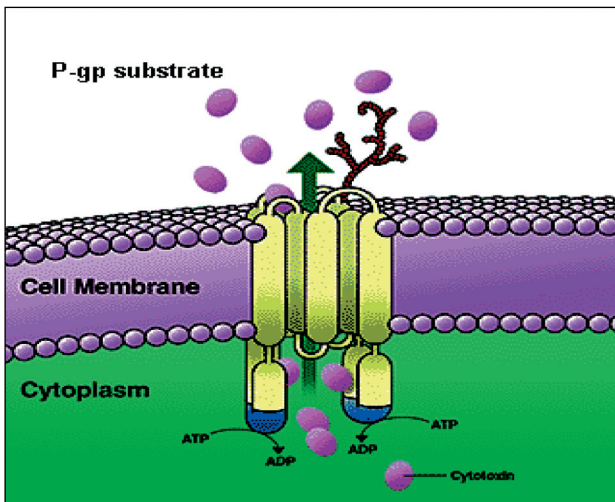
Key words: Breast neoplasms, *MDR1*, protein, gene expression, PCR, treatment, prognosis.

Úvod

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním žen. Přes značné pokroky v terapii zůstává významnou překážkou úspěšné léčby nádorových onemocnění rozvoj mnohočetné lékové rezistence (MDR z angl. multidrug resistance). Rezistence přitom nevzniká jen na

jedno léčivo, ale zpravidla na celou skupinu léčiv, které se liší strukturou i mechanismem účinku a díky tomu se tento fenomén nazývá mnohočetná léková rezistence (1). Jedním ze základních mechanismů vzniku MDR je transportní funkce některých transmembránových transportních proteinů ze skupiny tzv. ABC-transportérů (ATP binding cassette pro-

teins). V současné době je známo 49 lidských ABC-transportérů, které jsou rozděleny na základě sekvenční homologie do sedmi podrodin; ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF a ABCG (2). Jedním z nejvýznamnějších ABC-transportérů přispívajících k rozvoji MDR je P-glykoprotein (P-gp). Jedná se o transmembránový glykoprotein o velikosti 170kDa tvořený 1280 aminokyselinami (**obrázek č. 1**). Tato ATP-řízená effluxní pumpa využívá pro svou transportní funkci energii z hydrolyzy ATP (3). P-gp je kódován genem *MDR1* (alias *ABCB1*, *PGY1*, *P-GP*, *GP170*). *MDR1* je běžně exprimován v játrech, ledvinách, střevech, mozku, děloze, varlatech a placentě (4). Z toho vyplývá i jeho fyziologická funkce, kterou je především řízení absorpce, distribuce a exkrece celé řady xenobiotik včetně řady klinicky významných léčiv. Brání také průniku xenobiotik do mozku či reprodukčních orgánů (5). Substráty P-gp je přitom řada protinádorových léčiv jako vinka-alkaloidy, antiracykliny, epipodophylotoxiny, taxany, kolchicin a actinomycin D (4,6). Doxorubicin a taxany jsou přitom jedny z neúspěšnějších léků pokročilého karcinomu prsu. Jejich terapeutické použití je limitováno rozvojem MDR a především zvýšenou expresí P-gp, která s resistencí vůči taxanům a doxorubicinu *in vitro* koreluje (7). Expresí P-gp/*MDR1* byla nalezena jak v tkáni z okolí nádoru bez morfoloogicky prokázané přítomnosti nádorových buněk (8), tak v nádorové tkáni pacientek s karcinomem prsu (9,10). Expresí proteinu přitom často korelovala s expresí na úrovni genu (9,11).



Obrázek 1

V současné době existuje několik studií ukazujících jasnou souvislost mezi expresí P-gp/*MDR1* a klinicko-patologickými údaji pacientek (např. metastázy do axilárních lymfatických uzlin, 11,12). Vztahy k úspěšnosti chemoterapie karcinomem prsu (OS, DFS, odpověď) na úrovni proteinu (13,14,15,16) či mRNA byly rovněž publikovány (10,17). Naproti tomu existuje několik studií, jež vliv exprese P-gp/*MDR1* na rozvoj a průběh terapie karcinomem prsu neprokázaly (12,18,19,20). Z velké variability zveřejněných výsledků vyplývá potřeba individuálního stanovení míry exprese *MDR1* a jejího vlivu na rozvoj a úspěšnost terapie karcinomem prsu u konkrétních pacientek, zejména s ohledem na použitý terapeutický režim.

Předkládaná pilotní studie se zaměřila na (i) kvantitativní stanovení exprese *MDR1* v souboru pacientek s karcinomem prsu jako potenciálního prediktivního faktoru průběhu a úspěšnosti léčby, (ii) stanovení rozdílu v expresi *MDR1* mezi nádorovou tkání a tkání bez přítomnosti nádorových buněk (iii) stanovení korelace exprese *MDR1* s klinicko-patologickými prognostickými faktory. Hlavním cílem bylo, na základě nalezených souvislostí, zhodnotit význam exprese *MDR1* pro potenciální optimalizaci chemoterapie jednotlivých pacientek s karcinomem prsu.

Tabulka 1: Klinicko-patologické charakteristiky sledovaných pacientek

Charakteristika		N §
Průměrný věk v době diagnózy	63,7 ± 11,8	88 (100)
	≤ 40 let	3 (3,4)
	40 - 49 let	6 (6,8)
	50 - 59 let	26 (29,5)
	> 60 let	53 (60,3)
Stav menopauzy	premenopauzální	11 (12,5)
	postmenopauzální	77 (87,5)
Histologický typ nádoru	invasivní duktální karcinom	68 (77,3)
	invasivní lobulární karcinom	9 (10,2)
	jiný typ + a	11 (12,5)
Průměrná velikost nádoru	23,1 ± 13,9 mm	
	≤ 20 mm	50 (56,8)
Histologický grade	> 20 mm	38 (43,2)
	1	11 (12,5)
	2	45 (51,1)
	3	19 (21,6)
	X ^{ab}	13 (14,8)
Klinické stadium	I	29 (33,0)
	IIA	26 (29,5)
	IIB	15 (17,0)
	IIIA	5 (5,7)
	IIIB	8 (9,1)
	IV	2 (2,3)
neurčeno	3 (3,4)	
Receptor pro estrogen	pozitivní	51 (58,0)
	negativní	33 (37,5)
	neurčeno	4 (4,5)
Receptor pro progesteron	pozitivní	45 (51,1)
	negativní	39 (44,3)
	neurčeno	4 (4,5)
Postižení uzlin	pozitivní	40 (45,5)
	negativní	45 (51,1)
	neurčeno	3 (3,4)

§ N = počet pacientek a procentuální zastoupení uvedené v závorce, ^{ab} ve třech případech jednalo se o jiný typ nádoru než duktální či lobulární karcinom tzn.: mucinozní, 2x komedonový, 1x, medulární, 1x želatinosní, 1x tubulopapilární karcinom 3x, 1x atypický trabekulární, 1x malobuněčný karcinom a 1x duktální karcinom in situ, X^{ab} údaje o stanovení gradegradingu nebyly k dispozici

Pacientky a metody

Pacientky

Do studie bylo zahrnuto 88 nemocných s histologicky potvrzenou diagnózou karcinomem prsu z období let 1998 - 2005. U všech pacientek zařazených do studie byly sledovány následující údaje: věk v době diagnózy, osobní a rodinná

anamnéza (zahrnující informace o výskytu karcinomu prsu, vaječníků či dalších maligních onemocnění v blízkém příbuzenstvu), stav menopauzy a dále klinicko- patologická data jako stadium, histologický typ a grade nádoru, velikost nádoru, exprese receptorů pro estrogen (ER) a progesteron (PR). Klinicko-patologické charakteristiky sledovaného souboru pacientek jsou uvedeny v **tabulce č. 1**.

V celém souboru byl rovněž sledován způsob radioterapie a chemoterapie (neoadjuvantní, adjuvantní i paliativní), výsledek (kompletní odpověď, CR z angl. complete response vs. relaps), celkové přežívání (OS z angl. overall survival) a bezpříznakové přežívání (DFS z angl. disease-free survival). Tyto údaje shrnuje **tabulka č. 2**.

Všechny pacientky podepsaly formulář informovaného souhlasu ve shodě s Helsinskou deklarací a studie byla schválena etickou komisí Státního zdravotního ústavu v Praze.

Tabulka 2: Terapeutický profil a výsledek chemoterapie sledovaných pacientek

Charakteristika		N [§]
Terapie:		
Neznámá (pacientka není zařazena v databázi)		5 (5,7)
Chemoterapie		
bez chemoterapie		5 (5,7)
adjuvantní		59 (67,0)
neoadjuvantní		10 (11,4)
adjuvantní i neoadjuvantní		8 (9,1)
paliativní		8 (9,1)
Odpověď na terapii		
kompletní odpověď		62 (70,5)
relaps		21 (23,8)
neznámá odpověď		5 (5,7)
Přežití:		
Celkové (měsíce)	medián (rozsah: 4 - 112)	51,5
Bezpříznakové (měsíce)	medián (rozsah: 0 - 112)	45
Počet úmrtí		12 (13,6)

§ N = počet pacientek a procentuelní zastoupení uvedené v závorce

Zpracování vzorků

Všem 88 pacientkám byl v průběhu operace odebrán vzorek nádoru a současně u 40 pacientek také vzorek bez jakýchkoliv morfologických známek karcinomu z přiléhající okolní tkáně. Vzorky řezů tkání byly ihned uloženy a uchovávány v tekutém dusíku. Všechny bioptické vzorky tkáně byly histologicky klasifikovány dle standardních diagnostických procedur. Patology bylo provedeno histologické zhodnocení tkáně, přičemž každý vzorek s obsahem nádorových buněk byl zařazen jako reprezentativní pro izolace nukleových kyselin. (Ve vzorcích okolní nenádorové tkáně nebyla morfologicky prokázána přítomnost nádorových buněk. 5 µm tenké kryostatové řezy nádorových a nenádorových tkání byly použity pro izolaci celkové RNA s využitím TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). Kvalita výsledného preparátu bylo ověřena agarózovou elektroforézou a koncentrace mRNA byla určena spektrofotometricky pomocí přístroje Cary 300 (Varian, Palo Alto, CA). Pro syntézu cDNA bylo použito 0,5 µg celkové RNA a kit RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Případná kontaminace genomovou DNA byla posouzena PCR

amplifikaací fragmentu kontrolního genu ubichitinu C za vzniku produktu z cDNA (190 bp) a z genomové DNA (1009 bp) popsanou metodou (21).

Kvantifikace pomocí real-time PCR

Vyšetření metodou real-time PCR bylo provedeno na systému RotorGene 2000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Reakční směs pro PCR sledovaného genu *MDR1* obsahovala 10 µl 20x TaqMan Universal PCR Master Mix, 1,0 µl specifické sondy (konečná koncentrace 250 nM, značení 6-FAM na 5' -konci a lapač NFQ na 3' -konci) a primerů pro *MDR1* (900 nM pro oba primery), 5 µl 5x ředěné cDNA a do konečného objemu 20 µl byla doplněna ultračistou vodou. Podmínky PCR reakce byly následující: počáteční aktivace HotStar Taq polymerázy 2 min při 50°C, úvodní denaturace 10 min při 95°C následovaná 55 cykly sestávajícími se z denaturace 15 s při 95° a annealingu/extenze 60 s při 58°C. Fluorescence byla měřena na konci každého cyklu. Všechny vzorky byly analyzovány v duplikátech. Negativní kontrolní reakce obsahovala vodu místo vyšetřované cDNA. Pro vyloučení možné kontaminace z předchozích kroků přípravy RNA a cDNA byla rovněž použita negativní kontrola vyšetřované cDNA připravená současně se vzorkovou cDNA bez přidání reverzní transkriptázy. Současně se vzorky byly v průběhu real-time PCR měřeny i standardy obsahující cílovou sekvenci *MDR1* naklonovanou do plasmidu *pDONR201* (rozsah; 10² - 10⁶ kopií DNA/reakci). Množství vyšetřované cDNA bylo stanoveno metodou absolutní kvantifikace s využitím kalibrační křivky sestavené z použitých standardů. Jako kontrolní gen byl využit cyklofilin A (*CYCA*), který byl stanoven za stejných podmínek PCR amplifikace jako *MDR1* a při použití komerčně dostupné sady TaqMan Human PPIA Endogenous Control (Applied Biosystems, Foster City, CA) obsahující sadu specifických primerů pro *CYCA* a fluorescenčně značené sondy (kit č. 4333763F).

Příprava *MDR1* standardů pro real-time PCR

Pro přípravu standardů *MDR1* byla použita cílová sekvence genu překrývající oblast exonů 18-28 (1500 bp) připravená pomocí specifických primerů, forward: TGGAGAGATCCTACCAAGC a reverse: ACTGGGCGCTTTGTTCCAG. Pro *CYCA* byla zvolena oblast exonů 3 - 5 (738 bp) připravená ze specifických primerů, forward: AGGGTTCCTGCTTTCACAGA a reverse: CCGAGT-TGGCTACATTT. PCR produkty těchto fragmentů byly naklonovány do vektoru *pDONR201* užitím GatewayTM Cloning Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA). Vstupní plasmidy byly poté namnoženy v *Escherichia coli* DH5α Maximum Efficiency Cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) a izolovány pomocí Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Koncentrace izolovaných plasmidů byla určena spektrofotometricky.

Analýza dat

Vyhodnocení real-time PCR reakcí bylo prováděno softwarem Rotor- Gene verze 6.0 (Corbett-Research). Exprese *MDR1* byla analyzována metodou absolutní kvantifikace s využitím externí křivky standardů *pDONR/MDR1* plasmidu o koncentracích: 100, 10³, 10⁴, 10⁵ a 10⁶ kopií/vzorek. Množství vznikajícího počtu kopií *MDR1* v každém vzorku bylo vztaženo na µg celkové RNA. Podobně bylo vyhodnoceno i množství počtu

kopii kontrolního genu *CYCA*. Nakonec byla provedena normalizace počtu kopií *MDR1* na počet kopií *CYCA* ($\text{kopie}_{MDR1} / \text{kopie}_{CYCA}$).

Míra exprese byla hodnocena vzhledem k věku při diagnóze a velikosti nádoru v mm Pearsonovým a Spearmanovým korelačním testem (celkem 4 testy). Vztah exprese k menopauze (pre vs. post), typu (duktální vs. lobulární), grade (grade 1 vs. 2 vs. 3), stádiu (0, I, II vs. III a IV), TNM klasifikaci podle International Union Against Cancer (UICC), exprese receptoru pro estrogen a pro progesteron (pozitivní vs. negativní) a léčebné odpovědi (kompletní odpověď vs. relaps) byl hodnocen testem variance ANOVA (10 testů). Pro analýzy vztahů exprese *MDR1* k celkovému a bezpříznakovému přežívání pacientek rozdělených podle druhu chemoterapie (antracykliny a/nebo taxany vs. ostatní a hormonální léčba vs. ostatní) byly pacientky rozděleny na dvě skupiny se stejným počtem osob (vysoká exprese *MDR1* vs. nízká exprese *MDR1*). K těmto analýzám byl použit Kaplan-Meier test (5 testů). Hodnota $P < 0,05$ byla považována za signifikantní. Statistická analýza byla provedena programem SPSS v12,0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Výsledky

Expres *MDR1* detekovaná metodou real-time PCR

Vzorky nádorů byly odebrány během chirurgického výkonu celkem od 88 pacientek. Současně bylo získáno 40 vzorků přiléhající nenádorové tkáně. Dostatečné množství celkové RNA bylo izolováno ze všech uvedených vzorků. Transkripty *MDR1* byly zjištěny v 87 (98,9 %) vzorcích nádorové tkáně a ve 39 (97,5 %) vzorcích nenádorové tkáně. U jedné pacientky nebyla exprese *MDR1* detekována v nádorové ani v nenádorové tkáni, zřejmě díky degradaci RNA. Expres *MDR1* se vyznačovala velkou interindividuální variabilitou mezi jednotlivými pacientkami. Při porovnání rozdílů exprese v obou typech tkání byla nalezena významně vyšší průměrná exprese *MDR1* v nenádorové tkáni oproti nádorové (35 z 39 vzorků, tj. 89,7 %, $P < 0,001$ viz. **tabulka č. 3 a obrázek č. 2**). Pro pacientky s vyšší expresí *MDR1* v nádorové tkáni, může mít tento fakt klinický dopad na terapii, jak je dále diskutováno.

Korelace exprese *MDR1* s dokumentovanými klinicko-patologickými daty pacientek

Sledovaný soubor pacientek byl charakterizován na základě řady nejčastěji sledovaných klinicko-patologických údajů (viz. **tabulka č. 1**). Více než polovina pacientek byla v době diagnózy starší 60 let (60,3%) a po menopauze (87,5 %). Většina pacientek byla v lokálně rozvinutých stádiích I, IIA či IIB (79,5 %). Z parametrů týkajících se přímo nádorů lze shrnout, že se většinou jednalo o invazivní duktální karcinom prsu (77,3 %) s průměrnou velikostí $23,1 \pm 13,9$ mm. Srovnání míry exprese *MDR1*

v nádorové tkáni pacientek (poměru mezi expresí *MDR1* a *CYCA* na mg RNA) se sledovanými klinicko-patologickými faktory ukázalo nevýznamnou korelaci s klinickým stádiem. Pacientky ve stádiu I měly vyšší expresi *MDR1* ($0,0139 \pm 0,0036$) než pacientky v pokročilejších stádiích II - IV ($0,0071 \pm 0,0019$, ANOVA, $F = 3,71$ a $P = 0,058$). Podobně, pacientky s nádory menšími než 20 mm (T1) měly vyšší expresi *MDR1* ($0,0131 \pm 0,0033$) než pacientky s nádory většími než 20 mm (T2-T4; $0,0074 \pm 0,0023$) (ANOVA, $F = 2,19$ a $P = 0,143$). Expres *MDR1* nebyla ve významném vztahu se žádným z dále sledovaných údajů (stav menopausy, typ a stupeň nádoru, počet postižených uzlin, exprese hormonálních receptorů, léčebná odpověď).

Korelace exprese *MDR1* s dokumentovaným terapeutickým profilem a úspěšností terapie karcinomu prsu

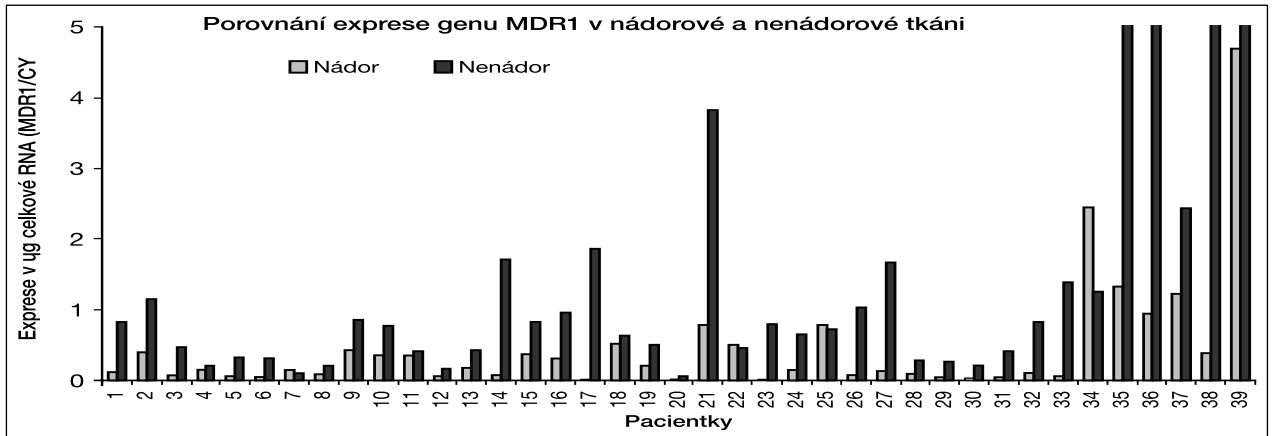
Použité režimy terapie a srovnání léčebných odpovědí jsou uvedeny v **tabulce č. 2**. Pacientky s nejvyšší expresí *MDR1* se nelišily v klinicko-patologických charakteristikách od ostatních nemocných. Z celého souboru 88 pacientek nebyla k dispozici chemoterapeutická data ani přežívání u 5 pacientek, které po operaci nepokračovaly v léčbě ve spolupracujících klinických zařízeních. Tyto pacientky byly vyřazeny ze statistických analýz vztahů exprese *MDR1* s typem a výsledkem terapie. Pacientky zahrnuté ve studii byly rozděleny na dvě skupiny podle použití antracyklinů či taxanů v jejich chemoterapeutické léčbě (antracykliny a/nebo taxany vs. ostatní režimy). V dalším kole analýz byly ještě pacientky rozděleny na skupiny léčené pouze hormonálně (tamoxifen a/nebo inhibitory aromatáz vs. ostatní režimy). Neoadjuvantní chemoterapie použitá u 11 pacientek zahrnovala u 8 pacientek použití antracyklinů (kombinace 5-fluorouracil/adriamycin/cyklofosfamid = FAC, 5-fluorouracil/epirubicin/cyklofosfamid = FEC, adriamycin/cyklofosfamid = AC) nebo taxanů (paclitaxel, docetaxel, epirubicin/docetaxel = ED). V adjuvantní systémové léčbě byly použity režimy na základě antracyklinů (kombinace FAC, FEC, AC) či taxanů (paclitaxel, docetaxel) u 17 pacientek, 10 pacientkám byla aplikována kombinace cyklofosfamid/metotrexát/5-fluorouracil = CMF a 32 pacientek podstoupilo hormonální terapii antiestrogeny (tamoxifen) či inhibitory aromatázy (anastrozol, letrozol či jiné). Medián celkového přežití (OS) činil 51,5 měsíce a bezpříznakového přežívání (DFS) pak 45 měsíců. Ze souboru pacientek zařazeného ve studii došlo u 21 (23,8 %) pacientek k relapsu onemocnění po použité chemoterapii a 12 nemocných (13,6 %) pacientek zemřelo. Nakonec bylo z analýz vyřazeno 6 pacientek, u kterých byl karcinom prsu sekundárním nádorem. Důvodem byla obava z možnosti ovlivnění výsledků předchozí chemoterapie primárního karcinomu. Ke konečnému statistickému zhodnocení bylo tedy do souboru zařazeno 82 pacientek.

Tabulka 3: Porovnání exprese *MDR1* v nádoru a nenádorové tkáni karcinomu prsu

Typ vzorku	N [§]	Expres <i>MDR1</i> (vyjádřená jako poměr počtu kopií na mg RNA <i>MDR1</i> / <i>CYCA</i>)					
		Minimum	Maximum	Průměr	SE	Medián	Variabilita
nádor	39	0,0127	4,6878	0,4558	0,1350	0,1446	369-krát
nenádorová tkáň*	39	0,0566	30,8345	2,4982	0,9525	0,7711	546-krát

[§] počet sledovaných vzorků; Pearsonův test $r = 0,804$, $P < 0,001$ pro nádor vs. nenádorovou tkáň.

* tkáň z okolí nádoru bez morfologicky detekovaných nádorových buněk



Obrázek č. 2

Pro hodnocení významu exprese *MDR1* byly pacientky rozděleny na dvě stejně velké skupiny (41 pacientek s vysokou vs. 41 pacientek s nízkou expresí). Pacientky s vysokou expresí *MDR1* léčené antracykliny nebo taxany a to v jakémkoliv podání (neoadjuvantním, adjuvantním, paliativním či kombinovaném) přežily kratší dobu než pacientky léčené jinými režimy, ovšem výsledek nebyl signifikantní (Kaplan-Meier test pro OS, $P = 0,090$). U pacientek s nízkou expresí *MDR1* se přežívání nelišilo ($P = 0,746$). Riziko relapsu u pacientek s vysokou expresí *MDR1* bylo významně vyšší v případě, že byly léčeny antracykliny nebo taxany (Kaplan-Meier test pro DFS, $P = 0,031$). Podobně jako v případě OS se u pacientek s nízkou expresí *MDR1* přežívání významně nelišilo ($P = 0,244$). Tento trend byl nepřímo potvrzen i výsledkem analýz u pacientek léčených pouze hormonálně (tamoxifen či inhibitory aromatáz). Pacientky s vysokou expresí *MDR1* přežily významně déle bez relapsu pokud byly léčeny pouze hormonálně než pacientky léčené jinými režimy (chemoterapie taxany, antracykliny, CMF apod.) (Kaplan-Meier test pro DFS, $P = 0,037$). U pacientek s nízkou expresí se DFS po rozdělení podle terapie významně nelišil ($P = 0,759$). Pro sledování vlivu exprese *MDR1* na úspěšnost chemoterapie byly pacientky rozděleny na základě toho, zda byl používán v terapii substrát P-gp či nikoliv, protože právě u těchto látek je předpoklad ovlivnění účinnosti cytotatik mírou exprese *MDR1*.

Výsledky byly ovšem hodnoceny i bez ohledu na míru exprese *MDR1*, jak uvádí další odstavec.

Při posuzování úspěšnosti chemoterapie bez ohledu na expresi *MDR1* bylo bezpříznakové přežívání pacientek léčených antracykliny či taxany oproti pacientkám léčeným ostatními režimy kratší, ale jen na hranici významnosti (Kaplan-Meier test pro DFS, $P = 0,052$). Celkové přežívání všech takto léčených pacientek se tedy významně nelišilo (Kaplan-Meier test pro OS, $P = 0,273$). Obdobně bez posuzování ohledu na expresi *MDR1* léčba pouze hormonálními preparáty ve srovnání s jinými režimy neměla na DFS ani OS všech pacientek významný vliv.

Stejně tak se DFS OS ani OS DFS významně nelišily prostým porovnáním pacientek ve skupinách pacientek s vysokou vs. nízkou expresí *MDR1*.

Diskuse

Naše výsledky prokazují expresi genu *MDR1* v nádorech i okolní přiléhající nenádorové tkáni metodou real-time PCR. Expres v nádorové i nenádorové tkáni již byla u pacientek s karcinomem prsu dokumentována (8,9,10,11). Imunohistochemicky byla pozitivita exprese P-gp pozorována průměrně ve 46% nádorů (rozmezí 35,6 - 56,2) v celkem 28 studiích zahrnujících více než 20 subjektů. Genová expres pak byla detekována zhruba v 63% případech (12 studií) v rozsahu 0 až 100% jak shrnuje *Leonessa and Clarke* (20). Podíl detekce exprese *MDR1* vzrostl díky vysoké citlivosti metody real-time PCR používané v poslední době. Tato práce měla za cíl porovnat rozdíly exprese *MDR1* mezi nádorovou a nenádorovou tkání u pacientek s karcinomem prsu. Výsledky lze shrnout konstatováním, že u většiny pacientek dochází k deregulaci exprese v nádorové oproti nenádorové tkáni. U některých pacientek však naopak expres *MDR1* v nádorové tkáni silně převažuje. V nenádorové tkáni přitom byla nalezena indukce exprese *MDR1* po provedení chemoterapie ($n = 40$, cit. 22). Expres *MDR1* se tedy jeví jako obecný fenomén vyskytující se v nenádorové i nádorové tkáni, jehož klinický dopad není stále jasný a jeví se jako velmi aktuální pro podrobné studium ve vztahu k různým léčebným režimům.

Pro posouzení významu exprese *MDR1* v nádorech karcinomu prsu pro prognózu vývoje onemocnění jsme porovnávali výsledky sledování exprese *MDR1* v nádorech s klinicko-patologickými údaji pacientek. Na rozdíl od některých zahraničních studií se souvislost exprese *MDR1* s klinicko-patologickými údaji nepodařilo potvrdit. Dříve byly nalezeny korelace míry exprese P-gp detekovaného imunohistochemicky s vyšším gradingem (G3) karcinomu prsu (cit. 12, $n = 177$; cit. 14, $n = 104$). *Schneider et al.* (11) našel významnou souvislost mezi expresí *MDR1* a metastatické postižení axilárních lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem prsu ($n = 46$). V souboru 22 pacientek s detekovanou expresí *MDR1* bylo 81,8% (18/22) případů se zasažením uzlin na rozdíl od skupiny pacientek, kde *MDR1* detekován nebyl. Korelaci mezi zasažením uzlin a vyšší expresí P-gp našel nedávno *Surowiak et al.* (14, $n = 104$). Korelace dalších klinicko-patologických charakteristik s expresí P-gp/*MDR1* dosud nebyly publikovány. V nedávné studii *Moureau-Zabotto*

et al. (19) nebyla u 164 pacientek nalezena korelace exprese *MDR1* s žádným z klinicko-patologických údajů. Podobným výsledkem skončila i naše studie. Pouze pacientky ve stádiu I měly nevýznamně vyšší expresi *MDR1* ve srovnání s pacientkami v pokročilejších stádiích ($P = 0,058$).

Pro posouzení významu míry exprese *MDR1* pro predikci úspěšnosti chemoterapie je rozhodujícím faktorem výběr cytostatika. V případě použití cytostatik, které jsou substráty P-gp, např.: antracykliny či taxany (7) existuje předpoklad, že terapie může vést ke vzniku MDR. Díky případně zvýšené expresi *MDR1* mohou být taková léčiva za účasti transportní funkce P-gp předčasně vylučována z nádorových buněk, což může způsobit pokles účinku léčby. Pro analýzy byly tedy pacientky rozděleny na dvě skupiny (ošetřené substráty P-gp, tj. antracykliny a/nebo taxany vs. ošetřené ostatními režimy). Riziko relapsu u pacientek s vysokou expresí *MDR1* bylo významně vyšší ($P = 0,031$) a celkové přežívání nevýznamně kratší ($P = 0,090$) v případě, že byly léčeny antracykliny nebo taxany. U pacientek s nízkou expresí *MDR1* se přežívání podle terapie významně nelišilo. Jsme si vědomi toho, že rozdělení pacientek pouze na základě léčby plně nerespektuje význam prognostických faktorů, jež jsou pro stanovení léčby zásadní (např.: stavu hormonálních receptorů či velikosti nádoru a postižení uzlin). Pro hodnocení vlivu exprese *MDR1* byly tak statistické analýzy rozdělením na dvě skupiny podle terapie silně zjednodušeny. U skupiny pacientek léčených antracykliny nebo taxany se jedná o selekci nemocných pacientek s obecně horší prognózou. Důvodem pro toto zjednodušení byl fakt, že zařazením prognostických kritérií do analýz by se sledovaný soubor rozpadl na obtížně hodnotitelné (příliš malé) skupiny přesto, že jde o studii dostupných nemocných ze dvou velkých pražských nemocnic po dobu 7 let. Proto je třeba zdůraznit, že prognostické faktory mohly výsledky analýz značně zkreslit (bias). Pro návrh větší cílenou studie, která bude průběžně pokračovat, nám však zjednodušené hodnocení poskytuje potřebné vodítko. V zahraniční literatu-

ře jsme našli studie obdobného typu, z nichž řada podporuje námi dosažené výsledky.

Vysoká exprese *MDR1* korelovala s horší odpovědí na chemoterapii primárních karcinomů prsu antracykliny v režimech FAC/FEC ($n = 59$, cit. 17). Pozitivita exprese P-gp proteinu rovněž korelovala s nízkou odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii režimem FAC u pacientek s karcinomy prsu ($n = 50$, cit. 15). Oproti tomu ve skupině pacientek podstupujících adjuvantní chemoterapii kombinací CMF nebyl prokázán vliv exprese P-gp (12) či jeho genu *MDR1* (17). Také v některých dalších studiích zabývajících se vlivem exprese *MDR1* na úspěšnost chemoterapie nebyly nalezeny korelace (18,19). Jednalo se však o studie, ve kterých byl hodnocen vliv míry exprese *MDR1* na OS či DFS eventuelně PFS (progress-free-survival) bez ohledu na režim chemoterapie. Naše studie tyto závěry potvrzuje, protože bezpříznakové ani celkové přežívání pacientek, bez ohledu na terapii, se mezi skupinou s vysokou a nízkou expresí *MDR1* nelišilo ($P = 0,560$ pro DFS resp. $P = 0,883$ pro OS).

Závěr

Pilotní studie sledující expresi *MDR1* v souboru pacientek české populace s karcinomem prsu získaném ze dvou z pražských nemocnic prokázala, že kvantitativní real-time PCR pro *MDR1* může být úspěšně využita k detekci exprese *MDR1* v nádorové i v nenádorové tkáni. V nádorové tkáni u většiny pacientek byla nalezena down-regulace exprese *MDR1*. Na základě dosažených výsledků lze vyvodit, že exprese *MDR1* pravděpodobně neovlivňuje prognózu karcinomu prsu. Na druhou stranu se exprese *MDR1* jeví jako potenciální prediktivní faktor úspěšnosti chemoterapie v případě jeho vysoké hladiny exprese v nádorové tkáni a využití chemoterapie na základě substrátů P-gp. Sledování exprese *MDR1* u většího a přesněji definovaného souboru pacientek by mohlo vést k návrhu studie vedoucí k ověření uvedených výsledků a jejich využití v klinické praxi.

Poděkování: Projekt byl podpořen granty IGA 1A/8248-3, GAČR 305/07/P347 a výzkumným programem na podporu mladých vědců SZÚ Praha.

Literatura

- Gottesman MM and Pastan I: Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, 1993, 62: 385-427.
- <http://nutrigene.4t.com/translink.htm>
- Zhang JT: The multi-structural feature of the multidrug resistance gene product P-glycoprotein: implications for its mechanism of action (hypothesis). *Mol Membr Biol*, 2001, 18(2):145-152.
- Kuwano M, Uchiumi T, Hayakawa H et al.: The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci*, 2003, 94(1): 9-14.
- Schinkel AH: P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*, 1999, 36: 179-194.
- Ling V: Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1997, 40 Suppl: S3-8.
- Mechetner E, Kyshtoobayeva A, Zonis S et al.: Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expression by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(2): 389-398.
- Scala S, Saeki T, Lynch A et al.: Coexpression of TGF alpha, epidermal growth factor receptor, and P-glycoprotein in normal and benign diseased breast tissues. *Diagn Mol Pathol*, 1995, 4(2): 136-142.
- Charpin C, Vielh P, Duffaud F et al.: Quantitative immunocytochemical assays of P-glycoprotein in breast carcinomas: correlation to messenger RNA expression and to immunohistochemical prognostic indicators. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(20): 1539-1545.
- Correnti M, Cavazza ME, Guedez N et al.: Expression of the multidrug-resistance (MDR) gene in breast cancer. *J Chemother*, 1995, 7(5): 449-451.

11. Schneider J, Gonzalez-Roces S, Pollan M et al.: Expression of LRP and *MDR1* in locally advanced breast cancer predicts axillary node invasion at the time of rescue mastectomy after induction chemotherapy. *Breast Cancer Res*, 2001, 3(3): 183-191. Epub 2001 Feb 1.
12. Larkin A, O'Driscoll L, Kennedy S et al.: Investigation of MRP-1 protein and MDR-1 P-glycoprotein expression in invasive breast cancer: a prognostic study. *Int J Cancer*, 2004, 112(2): 286-294.
13. Koh EH, Chung HC, Lee KB et al.: The value of immunohistochemical detection of P-glycoprotein in breast cancer before and after induction chemotherapy. *Yonsei Med J*, 1992, 33(2): 137-142.
14. Surowiak P, Materna V, Matkowski R et al.: Relationship between the expression of cyclooxygenase 2 and *MDR1/P-glycoprotein* in invasive breast cancers and their prognostic significance. *Breast Cancer Res*, 2005, 7(5): R862-870. Epub 2005 Aug 25.
15. Chintamani, Singh JP, Mittal MK et al.: Role of p-glycoprotein expression in predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer- a prospective clinical study. *World J Surg Oncol*, 2005, 3: 61.
16. Chung HC, Rha SY, Kim JH et al.: P-glycoprotein: the intermediate end point of drug response to induction chemotherapy in locally advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1997, 42(1): 65-72.
17. Burger H, Foekens JA, Look MP et al.: RNA expression of breast cancer resistance protein, lung resistance-related protein, multidrug resistance-associated proteins 1 and 2, and multidrug resistance gene 1 in breast cancer: correlation with chemotherapeutic response. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(2): 827-836.
18. Seymour L, Bezwoda WR, Dansey RD: P-glycoprotein immunostaining correlates with ER and with high Ki67 expression but fails to predict anthracycline resistance in patients with advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(1): 61-69.
19. Moureau-Zabotto L, Ricci S, Lefranc JP et al.: Prognostic impact of multidrug resistance gene expression on the management of breast cancer in the context of adjuvant therapy based on a series of 171 patients. *Br J Cancer*, 2006, 94(4): 473-480.
20. Leonessa F and Clarke R: ATP binding cassette transporters and drug resistance in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 2003, 10(1): 43-73.
21. Soucek P, Anzenbacher P, Skoumalova I, Dvorak M: Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells*, 2005, 23:1417-1422.
22. Arnal M, Franco N, Fargeot P et al.: Enhancement of *mdr1* gene expression in normal tissue adjacent to advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 2000, 61(1): 13-20.
23. Gardiner T: Increased demand for glycoconjugates during stress. http://www.glycoscience.com/glycoscience/document_viewer.wm?FILENAME=D004 (2000).

Korespondenční adresa:

Mgr. Radka Václavíková PhD.,
 Oddělení Biotransformací, CPL, Státní zdravotní ústav,
 Šrobárova 48, 100 42 Praha 10
 E-mail: rvaclavikova@szu.cz

Došlo: 24. 1. 2007

Přijato: 6. 2. 2007