

# Метилирование гена *ADCY8* в плазме крови как предиктивный маркер ответа на неoadъювантную химиотерапию рака молочной железы

Кекеева Т.В.<sup>1</sup>, Жинжило Т.А.<sup>2</sup>, Ненахова Ю.Н.<sup>3</sup>, Лядов В.К.<sup>4</sup>, Богомазова С.Ю.<sup>2</sup>, Руденко В.В.<sup>1</sup>, Кузнецова Е.Б.<sup>1,5</sup>, Танас А.С.<sup>1</sup>, Залетаев Д.В.<sup>1,5</sup>, Стрельников В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, 115522, ул. Москворечье, д. 1, e-mail: kekeeva@mail.ru

<sup>2</sup> — ФГАУ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России, Москва, 125367, Ивановское ш., 3, e-mail: tatyana-zhinzhilo@yandex.ru

<sup>3</sup> — ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава России, Москва, 125993, ул. Баррикадная, д. 2/1; e-mail: lyullikalya@mail.ru

<sup>4</sup> — Клиническая больница №1 «МЕДСИ», Московская обл., Красногорский район, 143442, Пятницкое ш. 6-й км, vlyadov@gmail.com

<sup>5</sup> — Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д.8, стр.2, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

**Актуальность.** Неoadъювантная химиотерапия (НАХТ) в лечении рака молочной железы (PMЖ) — это лечебный подход, направленный на уменьшение размера местнораспространенных опухолей перед оперативным вмешательством. Наилучшим предиктором эффективности неoadъювантного лечения является полный ответ опухоли, определяемый как отсутствие жизнеспособных опухолевых клеток в молочной железе и регионарных лимфатических узлах. По данным разных авторов, этот результат достигается не более чем у 13–33% больных. Повышение эффективности НАХТ может быть достигнуто посредством определения маркеров, позволяющих оценить чувствительность к терапии. **Цель.** Проанализировать состояние метилирования промоторных областей генов *SLC9A3*, *DPYS*, *IRF4*, *ADCY8*, *KCNQ2*, *TERT*, *SYNDIG1* и *SKOR2* в материале опухоли и плазме крови с точки зрения возможности их использования в качестве предиктивных маркеров ответа на НАХТ у больных PMЖ. **Материалы и методы.** Материалом для исследования послужили биопсийные образцы опухоли (парафиновые блоки) и образцы крови, полученные до и после лечения, от 36 пациенток с диагнозом PMЖ. Анализ метилирования промоторных районов генов проводили методом метилчувствительной ПЦР. **Результаты.** Анализ метилирования в опухолевом биопсийном материале, полученном до лечения, показал следующие частоты метилирования генов: *SLC9A3* — 27,8% (10/36), *DPYS* — 8,3% (3/36), *IRF4* — 22,2% (8/36), *ADCY8* — 41,7% (15/36), *KCNQ2* — 27,8% (10/36), *TERT* — 8,3% (3/36), *SYNDIG1* — 16,7% (6/36) и *SKOR2* — 5,5% (2/36). Для дальнейшего исследования в плазме крови выбрали 3 гена с наибольшими частотами метилирования: *SLC9A3*, *KCNQ2* и *ADCY8*. Для гена *ADCY8* в плазме крови было выявлено статистически значимое различие в частотах метилирования между группами с различной степенью лечебного патоморфоза (метилирование чаще наблюдалось в группе с плохим ответом на лечение). **Выводы.** Наличие метилирования гена *ADCY8* в плазме крови до начала лечения может быть ассоциировано с плохим ответом на НАХТ у больных PMЖ.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, неoadъювантная химиотерапия, маркеры метилирования, плазма крови.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 18-15-00430).

## *ADCY8* gene methylation in plasma as a predictive marker of breast cancer neoadjuvant chemotherapy

Kekeeva T.V.<sup>1</sup>, Zhinzhilo T.A.<sup>2</sup>, Nenakhova Y.N.<sup>3</sup>, Lyadov V.K.<sup>4</sup>, Bogomazova S.Yu.<sup>2</sup>, Rudenko V.V.<sup>1</sup>, Kuznetsova E.B.<sup>1,5</sup>, Tanas A.S.<sup>1</sup>, Zaletaev D.V.<sup>1,5</sup>, Strelnikov V.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russian Federation, 115522, MoskvoRechye st. 1, e-mail: kekeeva@mail.ru

<sup>2</sup> — Medical and Rehabilitation Center, Moscow, Russia, 125367, Ivanovskoye sh., 3; e-mail: tatyana-zhinzhilo@yandex.ru

<sup>3</sup> — Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia, 125993, Barrikadnaya st., 2/1; e-mail: lyullikalya@mail.ru

<sup>4</sup> — Clinical Hospital №1 «MEDSI», Moscow Region, Krasnogorsky district, Russia, 143442, Pyatnitskoye sh, 6 km, vlyadov@gmail.com

<sup>5</sup> — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation, 119991, Trubetskaya St, 8, e-mail: kuznetsova.k@bk.ru

**Background.** Neoadjuvant chemotherapy (NAC) is a common practice for locally advanced breast cancer to downstage the disease to become operable. The top-of-the-line predictor of the effectiveness of neoadjuvant treatment is the pathologic complete response, defined as the absence of viable tumor cells in the mammary gland and regional lymph nodes. According to different studies, this result is achieved in no more than 13–33% of patients. Increasing the effectiveness of NACHT can be achieved through the identification of predictive markers that allow assessing the sensitivity to therapy. **Objective.** To assess the methylation status of *SLC9A3*,

*DPYS, IRF4, ADCY8, KCNQ2, TERT, SYNDIG1* and *SKOR2* genes in tumor and serum samples and to analyze its association with response to breast cancer neoadjuvant chemotherapy. **Material and methods.** Core biopsy and plasma samples were obtained before and after neoadjuvant chemotherapy from 36 primary breast cancer patients. DNA methylation status was assessed using methylation sensitive PCR. **Result.** DNA methylation analysis of tumor biopsy material obtained before treatment showed the following gene methylation frequencies: *SLC9A3* – 27.8% (10/36), *DPYS* – 8.3% (3/36), *IRF4* – 22.2% (8/36), *ADCY8* – 41.7% (15/36), *KCNQ2* – 27.8% (10/36), *TERT* – 8.3% (3/36), *SYNDIG1* – 16.7% (6/36) and *SKOR2* – 5.5% (2/36). For further investigation in the blood plasma, 3 genes with the highest methylation frequencies were selected: *SLC9A3*, *KCNQ2* and *ADCY8*. For the *ADCY8* gene in the blood plasma, a statistically significant difference in methylation frequencies ( $p = 0.0076$ , exact two-sided Fisher test) was found between groups with different degrees of therapeutic response (methylation was more often observed in the group with poor response to treatment). **Conclusion.** Our results indicate that the methylation status of *ADCY8* gene in plasma before treatment is associated with NAC pathological complete response in breast cancer.

**Key words.** Breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, methylation markers, blood plasma.

This study was supported by the research grant from the Russian Science Foundation (project No. 18-15-00430).

### Введение

Рак молочной железы (PMЖ) — наиболее частое злокачественное заболевание у женщин. Неoadъювантная химиотерапия (НАХТ) в лечении PMЖ — это лечебный подход, направленный на уменьшение размера местнораспространенных опухолей перед оперативным вмешательством. НАХТ является предпочтительной опцией во всех случаях, когда диагностируются большие по размеру (условно операбельные) опухоли, вовлечение в процесс регионарных лимфатических узлов, отечно-инфильтративная форма рака [1]. В настоящее время в качестве «золотого стандарта» НАХТ приняты антрациклинсодержащие схемы. Также широкое применение находят таксаны, в случаях Her2-положительных опухолей рассматриваются варианты использования герцептина [2].

Наилучшим предиктором эффективности лечения, коррелирующим с общей и безрецидивной выживаемостью, является полный ответ опухоли (pCR), определяемый как отсутствие жизнеспособных опухолевых клеток в молочной железе и регионарных лимфатических узлах [3]. По данным разных авторов, этот результат достигается не более чем у 13—33% больных (в зависимости от степени злокачественности, иммунофенотипа опухоли и схем противоопухолевой терапии) [1]. Повышение эффективности неoadъювантного лечения может быть достигнуто посредством определения факторов, позволяющих оценить чувствительность к НАХТ. Ряд работ свидетельствует о предиктивной значимости маркеров метилирования в отношении ответа на неoadъювантное лечение [4—7]. Однако отсутствие удовлетворительных результатов лечения, единой точки зрения в отношении показаний к проведению НАХТ и критериев, определяющих выбор схемы, обуславливают актуальность этой проблемы и необходимость проведения дальнейших исследований в этом направлении [8].

В недавней работе нами методом широкогеномного анализа метилирования RRBS было показано дифференциальное метилирование промоторных областей ряда генов в группах образцов PMЖ, различающихся чувствительностью к НАХТ [9]. Для дальнейшей валидации

нами были выбраны 8 генов: *SLC9A3*, *DPYS*, *IRF4*, *ADCY8*, *KCNQ2*, *TERT*, *SYNDIG1* и *SKOR2*. В настоящей работе проведен анализ метилирования вышеуказанных генов с точки зрения потенциала их использования как предикторных маркеров эффективности НАХТ у больных PMЖ при определении их в материале опухоли и плазме крови.

### Материалы и методы

*Материалом для исследования* послужили биопсийные образцы опухоли (парафиновые блоки) и образцы крови от 36 пациентов с диагнозом PMЖ, взятые в ФГАУ ЛРЦ. Гистологическую идентификацию тканей проводили в патологоанатомическом отделении ФГАУ ЛРЦ, в каждом образце было не менее 50% опухолевых клеток. Образцы венозной крови пациенток собирали дважды: до начала НАХТ и после окончания последнего курса.

Выделение ДНК из малых количеств биопсийного материала, фиксированного в формалине с последующей парафинизацией, проводили на колонках с абсорбирующей мембраной по протоколам коммерческого набора «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» («QIAGEN», Германия).

Венозную кровь (5 мл) собирали в пробирки, содержащие этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА). В течение 2 часов после забора крови плазму отделяли центрифугированием при комнатной температуре в течение 5 мин при 3500 об/мин, отбирали супернатант и повторно центрифугировали в течение 5 мин при 13 000 об/мин. ДНК из плазмы крови выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit («QIAGEN», Германия).

*Выделение ДНК* из малых количеств биопсийного материала, фиксированного в формалине с последующей парафинизацией, проводили на колонках с абсорбирующей мембраной по протоколам набора «QIAamp DNA FFPE Tissue Kit» («QIAGEN», Германия).

Образцы венозной крови пациенток (5 мл) собирали в пробирки с консервантом ЭДТА дважды: до начала

НАХТ и после окончания последнего курса. Плазму отделяли центрифугированием при комнатной температуре в течение 5 мин при 3500 об/мин, отбирали супернатант и повторно центрифугировали его в течение 5 мин при 13000 об/мин. ДНК из плазмы крови выделяли с помощью набора QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit («QIAGEN»).

Анализ метилирования промоторных областей генов проводили методом метилчувствительной полимеразной цепной реакции (МЧ-ПЦР) по схеме, описанной ранее [10].

### Результаты и обсуждение

Средний возраст больных составил 55 лет. ПА стадия опухолевого процесса была выявлена у 2 (5,7%), ПВ — у 16 (45,7%), ПИА — у 7 (20%), ПИБ — у 7 (20%), ПИС — у 3 (8,6%) больных. Люминальный А тип был выявлен у 7 (19,4%) пациенток, люминальный В/HER2 негативный — у 13 (36,1%); люминальный В/HER2 позитивный — у 3 (8,6%); HER2 позитивный — у 2 (5,7%); тройной негативный — у 11 (31,4%) больных.

Пациенткам назначались схемы химиотерапии на основе антрациклиновых препаратов — 29 (80,6%) больных; содержащие таксаны и препараты платины — 6 (16,7%) больных. Одной пациентке (2,8%) с люминальным В, HER2 позитивным раком проводилось лечение герцептином, препаратами платины и таксанами.

Первая степень лечебного патоморфоза (малозаметные изменения отдельных опухолевых клеток без уменьшения их числа) была выявлена у 7 (19,4%) пациенток; вторая степень (незначительное уменьшение количества инвазивных опухолевых клеток, но в целом клеточность остается высокой) — у 15 (41,6%) пациенток; третья степень (сокращение числа опухолевых клеток вплоть до 90% клеточных потерь) — у 10 (27,7%); четвертая степень (выраженное исчезновение инвазив-

ных клеток, определяются лишь широко рассеянные небольшие гнезда клеток) — у 1 (2,8%); пятая степень (нет определяемых инвазивных клеток в секционных срезах из места расположения первичной опухоли) — у 3 (8,3%).

Анализ ДНК в опухолевом биопсийном материале, полученном до лечения, показал следующие частоты метилирования генов: *SLC9A3* — 27,8% (10/36), *DPY5* — 8,3% (3/36), *IRF4* — 22,2% (8/36), *ADCY8* — 41,7% (15/36), *KCNQ2* — 27,8% (10/36), *TERT* — 8,3% (3/36), *SYNDIG1* — 16,7% (6/36) и *SKOR2* — 5,5% (2/36). На основании полученных данных для дальнейшего исследования в плазме крови мы выбрали 3 гена с наибольшими частотами метилирования: *SLC9A3*, *KCNQ2* и *ADCY8*. Частоты метилирования в плазме крови, взятой до неoadьювантного лечения и после него, представлены в табл. 1.

Основным методом, определяющим эффективность проводимого лечения, является морфологическое исследование, которое позволяет оценить степень лечебного патоморфоза опухоли под действием цитостатической терапии. Была изучена зависимость лечебного патоморфоза от стадии заболевания, подтипа РМЖ, схемы химиотерапии, а также от статуса метилирования генов *SLC9A3*, *KCNQ2* и *ADCY8* в опухоли и плазме крови.

Достоверных различий между группами с 1, 2, 3, 4, 5 степенями лечебного патоморфоза при сопоставлении стадии заболевания, подтипа РМЖ и схем химиотерапевтического лечения не обнаружено ( $p > 0,05$ , критерий  $\chi^2$ ). Также не было выявлено различия между ответами на лечение и частотами метилирования изученных генов в биопсийном материале.

Для гена *ADCY8*, метилированного в плазме до лечения, было выявлено статистически значимое различие по статусу метилирования между группами пациентов с различной степенью лечебного патоморфоза (табл. 2). Иными словами, ответ пациентов, у которых до лечения

Таблица 1

Частоты метилирования генов *SLC9A3*, *KCNQ2* и *ADCY8* в плазме крови больных РМЖ

Название гена	Частота метилирования гена в плазме до лечения, %	Частота метилирования гена в плазме после лечения, %
<i>SLC9A3</i>	0 (0/36)	5,5 (2/36)
<i>KCNQ2</i>	2,8 (1/36)	0 (0/36)
<i>ADCY8</i>	16,7 (6/36)	27,8 (10/36)

Таблица 2

Частота метилирования гена *ADCY8* в плазме в группах пациентов с различными степенями лечебного патоморфоза

Частота метилирования гена <i>ADCY8</i> в плазме, %	Степень лечебного патоморфоза				Критерий $\chi^2$ , р-значение
	1	2	3	4-5	
До лечения	57 (4/7)	0 (0/15)	20 (2/10)	0 (0/4)	$p = 0,007$
После лечения	0 (0/7)	33 (5/15)	30 (3/10)	50 (2/4)	$p = 0,269$

присутствовало метилирование в плазме, был хуже, чем у пациентов, у которых метилирования в плазме до лечения, не было. Статус метилирования гена *ADCY8* в плазме после проведенного лечения не отличался в группах с разным ответом на лечение.

Ген *ADCY8* кодирует фермент аденилатциклазу, катализирующий превращение АТФ в цАМФ, и участвует во множестве сигнальных путей. Гиперметилирование *ADCY8* было ранее показано для 9 типов опухолей, включая РМЖ [11]. В работе Shen-Gunther с соавт. метилирование этого гена ассоциировано с плохим прогнозом для рака шейки матки [12].

В нашей работе показано, что статус метилирования в плазме до начала лечения может быть ассоциирован с ответом на НАХТ. Прогностическое значение динамики изменения метилирования в плазме продемонстрировано в работе Takahashi с соавт. [6]. У пациентов с положительным статусом метилирования гена *RASSF1* до лечения после лечения было обнаружено снижение уровня метилирования в плазме, ассоциированное с ответом на терапию.

Дальнейшие работы, возможно, прояснят роль аденилатциклазы *ADCY8* в механизме восприимчивости опухолевой клетки к химиотерапевтическим агентам. Анализ расширенных выборок пациентов и сопоставление данных с молекулярными подтипами РМЖ может помочь в оценке ассоциации маркера с прогнозом заболевания и общей выживаемостью пациентов.

### Список литературы

1. Лазарева М.А., Павлов М.В., Шумская И.С., Овчинникова Е.Г., Ильинская О.Е., Орлова А.Г., Шахова Н.М., Масленникова А.В. Анализ эффективности неoadъювантной химиотерапии рака молочной железы. Онкогинекология. 2016. 4, 26-33.
2. Parekh T, Dodwell D, Sharma N, Shaaban A. Radiological and pathological predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a brief literature review. Pathobiology. 2015 82(3-4):124-32.
3. Fayanju OM, Ren Y, Thomas SM, Greenup RA, Plichta JK, Rosenberger L, Tamirisa N, Force J, Boughey JC, Hyslop T, Hwang ES. The Clinical Significance of Breast-only and Node-only Pathologic Complete Response (pCR) After Neoadjuvant Chemotherapy (NACT): A Review of 20,000 Breast Cancer Patients in the National Cancer Data Base (NCDB). Ann Surg. 2018. doi: 10.1097/SLA.0000000000002953.
4. Watanabe Y, Maeda I, Oikawa R, Wu W, Tsuchiya K, Miyoshi Y, Itoh F, Tsugawa K, Ohta T. Aberrant DNA methylation status of DNA repair genes in breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. Genes Cells. 2013. 18(12):1120-30.
5. Tsang JS, Vencken S, Sharaf O, Leen E, Kay EW, McNamara DA, Deasy J, Mulligan ED. Global DNA methylation is altered by neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer and may predict response to treatment — A pilot study. Eur J Surg Oncol. 2014. 40(11):1459-66.
6. Takahashi H, Kagara N, Tanei T, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, Shimazu K, Kim S, Noguchi S. Correlation of Methylated Circulating Tumor DNA With Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer Patients. Clinical Breast Cancer. 2017. 17(1):61-69e3.
7. Bhangu J, Beer A, Mittlbock M, Tamandl D, Pulverer W, Taghizadeh H, Stremitzer S, Kaczirek K, Gruenberger T, Gnant M, Bergmann M, Mannhalter C, Weinhouse A, Oehler R, Bachleitner-Hofmann T. Circulating Free Methylated Tumor DNA Markers for Sensitive Assessment of Tumor Burden and Early Response Monitoring in Patients Receiving Systemic Chemotherapy for Colorectal Cancer Liver Metastasis. Ann Surg. 2018. doi: 10.1097/SLA.0000000000002901.
8. Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Красулина Н.А., Дорошенко А.В., Кокорина Ю.Л. Неoadъювантная терапия при раке молочной железы. Сибирский онкологический журнал. 2005. 2 (14):63.
9. Tanas A.S., Poddubskaya E.V., Kekeeva T.V., Trotsenko I.D., Kuznetsova E.B., Zaletayev D.V., Strelnikov V.V. Breast cancer molecular classification based on DNA methylation assessed by reduced representation bisulfite sequencing. Eur J Hum Genet. 2015. 23 (S1):263.
10. Сигин В.О., Кузнецова Е.Б., Симонова О.А., Жевлова А.И., Литвяков Н.В., Слонимская Е.М., Цыганов М.М., Володин И.В., Шикеева А.А., Стрельников В.В., Залетаев Д.В., Танас А.С. Медицинская ДНК-технология оценки чувствительности опухолей молочной железы люминального В подтипа к неoadъювантной химиотерапии с применением антрациклинов на основе маркеров метилирования ДНК. Медицинская генетика. 2017;16(10):29-35.
11. Wang X, Xiao F, Li Q, Liu J, He Y, Li K. Qing-Peng. Large-scale DNA methylation expression analysis across 12 solid cancers reveals hypermethylation in the calcium-signaling pathway. Oncotarget. 2017. 8(7):11868-11876.
12. Shen-Gunther J, Wang CM, Poage GM, Lin CL, Perez L, Banks NA, Huang TH. Molecular Pap smear: HPV genotype and DNA methylation of *ADCY8*, *CDH8*, and *ZNF582* as an integrated biomarker for high-grade cervical cytology. Clin Epigenetics. 2016. 8:96. doi: 10.1186/s13148-016-0263-9.