

*В.Ф. Семиглазов¹, В.В. Семиглазов², Ф.В. Моисеенко^{1,3}, А.А. Богданов³, В.В. Бойцов³,
С.В. Вязьмин³, Д.Н. Гораб³, В.А. Чубенко¹, Н.В. Брежнев¹, В.С. Лукьянчикова¹,
М.В. Дубина³*

ЭКСПРЕССИОННЫЙ АНАЛИЗ И ЕГО КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИ ОПУХОЛЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

¹ ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург

² ФГБУ ВПО Санкт-Петербургский медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

³ ФГБУ ВПО Санкт-Петербургский Академический университет - научно-образовательный центр нанотехнологий РАН

Рак молочной железы—это гетерогенное заболевание как по прогнозу и течению, так и по морфологическим характеристикам. Используемая в настоящее время клинико-патоморфологическая классификация опухолей носит, в первую очередь, описательный характер. Появившиеся относительно недавно методы высокопродуктивного молекулярно-генетического анализа позволяют разрабатывать профили экспрессии, которые возможно в ближайшем будущем не только позволят более точно определять прогноз течения болезни, а также ее чувствительность к лекарственным препаратам, но и дадут начало новым представлениям о канцерогенезе и патогенетических механизмах опухолевой пролиферации.

Ключевые слова: рак молочной железы, полногеномный экспрессионный анализ, прогноз.

Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой гетерогенное заболевание, включающее в себя множество патоморфологических вариантов с различным клиническим течением [5]. Разнообразие форм опухолей молочной железы было известно довольно давно и учитывалось, в первую очередь, патоморфологами. С развитием высокопродуктивных молекулярно-генетических технологий и появлением гуманизированных моноклональных антител против многих онкогенов, а также сотен низкомолекулярных ингибиторов сигнальных каскадов, требования к классификации опухолей молочной железы, в частности, и злокачественных опухолей в целом, изменились. Одной из особенностей современных требований индивидуализированной медицины является необходимость предиктивной классификации новообразований взамен прогностической и описательной, использованной ранее.

Несмотря на многочисленные клинические и лабораторные исследования, проведенные в

80-х и 90-х годах прошлого века, до клинического рутинного использования дошли только три основных показателя: рецепторы эстрогенов (РЭ), рецепторы прогестерона и рецептор эпидермального фактора роста 2 типа человека (HER2). Интересно, что эти маркеры имеют выраженную предиктивную значимость. Так, использование эндокринотерапии чаще всего неэффективно при опухолях с негативной экспрессией РЭ. Точно также использование препаратов, направленных на блокирование HER2, нецелесообразно при опухолях, не экспрессирующих этот маркер. При этом, несмотря на существенное клиническое значение уровней экспрессии РЭ и HER2, можно однозначно говорить об относительно невысоком положительном предиктивном значении этих маркеров. Так, при высоком уровне экспрессии рецепторов стероидных гормонов (РЭ/ПП) только 50-60% больных «отвечают» на эндокринотерапию.

Значительный прорыв в систематизации опухолей, и в первую очередь рака молочной железы, был достигнут после изобретения высокопроизводительных методик определения молекулярно-генетических особенностей опухолей. Пионерской работой в молекулярной классификации опухолей молочной железы было исследование группы из Стэнфорда. Были разработаны сразу несколько экспрессионных «сигнатур», позволивших выделять различные с прогностической точки зрения подтипы.

Принцип методики гибридизационного анализа

На настоящий момент существует большое число различных платформ для выполнения экспрессионного анализа, отличающихся методом маркирования и оценки результатов. Тем не менее, принцип, лежащий в основе этого метода, остается прежним. Общий набор комплементарных ДНК (кДНК), то есть ДНК, синтезированной

ных комплементарно к зрелой РНК, или кРНК, полученных из экспериментального образца и промаркированных красителем, гибридизуется с элементами на микрочипе. Чаще всего элементы на поверхности чипа называются «зонды» и представляют собой олигонуклеотиды, комплементарные определенным последовательностям в геноме человека [10].

При наличии в исследуемой смеси кДНК последовательностей, комплементарных зондам, на поверхности чипа происходит гибридизация, то есть взаимодействие двух олигонуклеотидов. В случае, когда возникает подобное взаимодействие, образовавшийся комплекс начинает флюоресцировать. При этом степень свечения обусловлена количеством гибридизовавшихся олигонуклеотидов, то есть активностью синтеза конкретного участка гена в изучаемых клетках. Принимая во внимание то, что расположение каждого зонда на чипе картировано, детекция полученного свечения позволяет идентифицировать активность синтеза каждого конкретного участка гена.

Впервые применение чипов высокой плотности на основе кДНК с целью определения профиля экспрессии было описано L.H. Aeugenlich и др. в 1987 г. [3]. Как это часто случается в биологии, технологическое решение значительно опередило возможности его практического применения. Так, в случае микрочиповой методики анализ полученных результатов стал возможен только после создания генетических и экспрессионных библиотек, а также совершенствования методов флюоресцентной визуализации [19]. Анализ получаемых в ходе гибридизации данных представляет собой отдельную проблему, которая в настоящий момент решается несколькими путями и зависит от природы изучаемых образцов, что, однако, выходит за пределы темы этого обзора.

Оценка имеющихся на настоящий момент сведений

Идентификация генетических последовательностей, имеющих наибольшее значение с точки зрения патогенеза опухолей и ассоциированных с конкретным подтипом опухоли, позволяет более глубоко оценить механизмы опухолевой прогрессии, а также выявить новые мишени для направленного блокирования. Более того, сравнение различных видов опухолей с уже описанными свойствами, такими, например, как степень злокачественности, позволяет уточнить и объективизировать эти характеристики.

Так, ранние работы были направлены на идентификацию молекулярных механизмов, определяющих уже известные подтипы опухо-

лей. Примером такого подхода является основополагающее для опухолей молочной железы сравнение экспрессионного профиля опухолей с положительной и отрицательной экспрессией РЭ [18]. Несмотря на то, что полученные в ходе этой работы данные не являлись принципиально новыми, они позволили продемонстрировать потенциальную чувствительность и биологическую значимость метода. К настоящему моменту определены экспрессионные профили, ассоциированные с экспрессией РЭ, амплификацией HER2, мутационным статусом p53, степенью злокачественности, статусом лимфатических узлов [2, 4, 7, 9, 11, 13, 16].

Экспрессионный профиль опухолей молочной железы

Как уже отмечалось выше, рак молочной железы является генетически и морфологически гетерогенным заболеванием, что было подтверждено многочисленными исследованиями экспрессионного профиля опухолей молочной железы. Традиционные методы классификации опухолей молочной железы основываются, в первую очередь, на морфологических и клинических данных, что позволяет лишь частично отразить все разнообразие форм.

К настоящему моменту доступны результаты нескольких ключевых работ, в которых показана возможность дополнительного деления опухолей в пределах уже известных групп при помощи определения профиля экспрессии генетического аппарата клеток. Исторически наиболее очевидным фактором для стратификации опухолей молочной железы является статус РЭ. При этом последние исследования показали, что наличие экспрессии этого рецептора накладывает значительный отпечаток на экспрессию многих сотен активных участников внутриклеточных каскадов.

Однако экспрессионное профилирование позволило выделить новые подгруппы среди положительных и отрицательных по РЭ опухолей [18,21]. Так, в ранних работах было показано, что среди РЭ-негативных опухолей можно выделить три группы образований: экспрессирующие HER2, имеющие профиль эпителиальных клеток базальной мембраны и имеющие профиль, сходный с таковым нормальной ткани молочной железы. В свою очередь, позитивные по РЭ опухоли характеризовались более высоким уровнем экспрессии генов, ассоциированных с люминальными клетками молочной железы, что позволяет сделать предположение об их происхождении.

Различное происхождение РЭ—положительных и отрицательных опухолей получило даль-

нейшее подтверждение при иммуногистохимическом окрашивании специфическими для каждого типа клеток антителами: кератины 5/6 и 17 для базальноклеточных опухолей и кератины 8/18 для клеток люминального типа [18]. С точки зрения эпидемиологии базально-клеточные опухоли встречаются несколько реже и составляют, по разным данным, от 3 до 13% всех случаев опухолей молочной железы. Тем не менее, по последним публикациям, выделенная на настоящий момент группа базально-клеточных опухолей, по-видимому, включает в себя несколько гетерогенных видов, что подтверждается сложным профилем экспрессии ассоциированных с базальными клетками маркеров, среди которых виментин, p63, CD10, гладкомышечный актин—альфа и EGFR [1,15]. В свою очередь, подгруппа РЭ-положительных люминальных эпителиальных опухолей на основании профиля экспрессии разделяется на три подтипа, названных люминальный А, В и С, соответственно [20].

При этом, люминальный подтип А характеризуется более высокой экспрессией кластера генов, ассоциированных с РЭ, относительно подтипов В и С. С другой стороны, последние два подтипа экспрессируют на высоком уровне новый набор генов с неизвестной на настоящий момент функцией, которые задействованы также при базально-клеточном и HER2 -положительном подтипах.

Все вышесказанное дает основание предполагать, что молекулярно-генетическая классификация опухолей молочной железы еще далека от завершения. Постоянно появляющиеся данные о новых профилях экспрессии, о взаимодействии сигнальных каскадов в пределах уже выделенных подтипов, а также определение новых маркеров свидетельствуют о перспективности этого подхода и необходимости дальнейшего уточнения классификации опухолей молочной железы.

Прогностические характеристики

Логичным продолжением работ по классификации опухолей на основании экспрессионных профилей являются попытки выявления связи тех или иных характеристик с прогнозом заболевания, в частности, с риском возникновения метастазов. Практически одновременно двумя группами исследователей на основании анализа профиля экспрессии 70 генов была выявлена подгруппа больных с более высокой вероятностью метастазирования после радикального лечения [22,23]. При этом величина относительного риска возникновения отдаленных метастазов при сравнении группы с плохим и хорошим прогнозом равнялась 5,1 (95% ДИ; 2,9 -9,0;

$p < 0,001$). На основании этих крайне значимых результатов в настоящее время проводится два крупных проспективных исследования (EORTC и BIG), целью которых является подтверждение возможности определения больных с плохим прогнозом на основании экспрессии панели, предложенной в предыдущих работах. Несмотря на это, предварительный анализ показал несколько более низкую предиктивную силу молекулярного анализа: относительный риск времени до рецидива опухоли -1,85 (1,14-3,0) и общей выживаемости -2,5 (1,4-4,5). Тем не менее, полученные данные все-таки превышают стандартные прогностические маркеры, предложенные в Сан-Гален [8].

Кроме описанной выше модели, к настоящему времени разработаны и другие принципиально сходные профили, позволяющие идентифицировать группу высокого риска среди больных ранним раком молочной железы без поражения периферических лимфатических узлов (76-генный Роттердамский профиль), а также группы пациентов с промежуточной степенью злокачественности (Геномный индекс степени злокачественности -Genomic Grade Index). Однако, эти разработки нуждаются в подтверждении в проспективных клинических исследованиях.

Несмотря на крайне высокий интерес к возможностям фундаментального изучения канцерогенеза с помощью микрочиповой технологии, в целом отношение к клиническому применению этой методики для определения прогноза заболевания можно оценить как сдержанный скептицизм. Оснований для этого несколько. Во-первых, проведение дорогостоящего исследования пока лишь незначительно дополняет данные рутинных методов, например, иммуногистохимической окраски на РЭ, HER2, Ki67. Во-вторых, уже имеющиеся данные получены по большей части на гетерогенных по своему морфологическому профилю опухолях и нуждаются в дополнительной проверке на независимых выборках больных. И в-третьих, несмотря на высокую чувствительность существующих микрочипов, у 5-10% больных используемая модель дает ошибочные результаты, что косвенно говорит о неабсолютном понимании процессов, лежащих в основе возникновения этих опухолей [6].

Предиктивные профили

Параллельно несколькими группами были проведены попытки анализа результатов экспрессионного профилирования с целью выявления больных с наибольшей вероятностью ответа на определенное лекарственное лечение. Одним из первых наборов, который позволял выявить кандидатов для проведения терапии

антиэстрогенами, стал Oncotype DX (Genomic Health). Данный набор основан на проведении нескольких ПЦР в реальном времени на генетическом материале, полученном из парафиновых блоков пациентов. Для дизайна этого набора были изучены 250 генов-кандидатов, отобранных из данных литературы, геномных баз данных и внутренних исследований компании производителя. С целью последующего использования было отобрано 16 целевых «онкогенов» и 5 референсных генов, программный анализ экспрессии которых позволил стратифицировать больных по вероятности рецидива заболевания в течение 10 лет после радикального лечения.

Клинической базой для проведения корреляционных анализов послужили два крупных исследования: NSABP-B14, в котором больные РЭ–положительным РМЖ без метастазов в регионарных лимфатических узлах рандомизировались в группу адьювантного тамоксифена и плацебо, и исследование NSABP-B20 с аналогичной популяцией пациенток, но рандомизацией на получение тамоксифена и дополнительную цитостатическую терапию по схеме CMF с последующим лечением тамоксифеном [17]. Результаты экспрессионного анализа в комплексе с клиническими данными пациенток позволили выделить три группы риска: низкий (шкала риска менее 18), промежуточный риск (шкала риска от 18 до 30) и высокий риск (шкала риска более 30).

В дополнение к чипам, идентифицирующим больных, принципиально нуждающихся в проведении системного лечения, в настоящее время изучаются генетические профили, позволяющие выделить больных, потенциально более чувствительных к конкретным цитостатическим препаратам [6]. Наиболее часто подобные профили разрабатываются на модели неоадьювантной (предоперационной) химиотерапии опухолей. Так, в одной из работ, включившей 133 больных, получавших предоперационную химиотерапию паклитакселом (Т)/FAC, был идентифицирован 30-зондовый профиль, предсказывающий эффективность таксанов [12]. В результате этой работы был предложен чип, позволяющий предсказывать вероятность полного патоморфологического регресса опухоли с чувствительностью 92% и специфичностью 71%. Относительно недавно началось проспективное исследование по оценке этого профиля.

Другим интересным подходом к решению проблемы определения чувствительности к цитостатическим препаратам является определение экспрессионного профиля, специфичного для чувствительности, путем скрининга клеточных линий. Так, в одной из работ изучение 60 клеточных линий опухолей молочной железы поз-

волило разработать профиль, который при проверке на небольшой группе больных достоверно предсказывал чувствительность к доцетакселу [14].

Заключение

Ранние работы по изучению экспрессионных профилей опухолей молочной железы позволили идентифицировать подгруппы среди уже существующих нозологических форм. Кроме того, в настоящий момент получают клиническое подтверждение некоторые из описанных профилей, что, не исключено, в ближайшем будущем даст возможность предсказывать чувствительность к отдельным цитостатическим препаратам и избавить многих пациентов от неэффективного токсичного лечения.

В качестве одного из самых перспективных направлений развития молекулярно-генетических представлений о патогенезе опухолей молочной железы в настоящий момент представляются чипы, позволяющие одномоментно получить данные о полногеномном экспрессионном профиле ткани. Полученная таким образом информация, как ожидается, поможет более полно представить картину молекулярных нарушений, присутствующих в опухоли и, возможно, идентифицировать наиболее подходящие мишени для противоопухолевого лечения.

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 8294 от 10 августа 2012 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abd El-Rehim D.M., Pinder S.E., Paish C.E. et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma // *J Pathol.*-2004.—Vol. 203 (2).—P. 661-671.
2. Ahr A., Holtrich U., Solbach C. et al. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling // *J Pathol.*—2001.—Vol. 195 (3).—P. 312-320.
3. Augenlicht L.H., Wahrman M.Z., Halsey H. et al. Expression of cloned sequences in biopsies of human colonic tissue and in colonic carcinoma cells induced to differentiate in vitro // *Cancer Res.*—1987.—Vol. 47 (22).—P. 6017-6021.
4. Bertucci F., Borie N., Ginestier C. et al. Identification and validation of an ERBB2 gene expression signature in breast cancers // *Oncogene*—2004.—Vol. 23 (14).—P. 2564-2575.
5. Correa Geyer F., Reis-Filho J.S. Microarray-based gene expression profiling as a clinical tool for breast cancer management: are we there yet? // *Int J Surg Pathol.*—2009.—Vol. 17 (4).—P. 285-302.
6. Desmedt C., Ruiz-Garcia E., Andre F. Gene expression predictors in breast cancer: current status, limitations and perspectives // *Eur J Cancer*—2008.—Vol. 44 (18).—P. 2714-2720.

7. Dressman M.A., Baras A., Malinowski R. et al. Gene expression profiling detects gene amplification and differentiates tumor types in breast cancer // *Cancer Res.*—2003.—Vol. 63 (9).—P. 2194-2199.
8. Goldhirsch A., Wood W.C., Gelber R.D. et al. Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer // *J Clin Oncol.*—2003.—Vol. 21 (17).—P. 3357-3365.
9. Gruberger-Saal S.K., Bendahl P.O., Saal L.H. et al. Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma // *Clin Cancer Res.*—2007.—Vol. 13 (7).—P. 1987-1994.
10. Gruberger-Saal S.K., Cunliffe H.E., Carr K.M., Hedenfalk I.A. Microarrays in breast cancer research and clinical practice--the future lies ahead // *Endocr Relat Cancer.*—2006.—Vol. 13 (4).—P. 1017-1031.
11. Gruberger S., Ringner M., Chen Y. et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns // *Cancer Res.*—2001.—Vol. 61 (16).—P. 5979-5984.
12. Hess K.R., Anderson K., Symmans W.F. et al. Pharmacogenomic predictor of sensitivity to preoperative chemotherapy with paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide in breast cancer // *J Clin Oncol.*—2006.—Vol. 24 (26).—P. 4236-4244.
13. Iwao K., Matoba R., Ueno N. et al. Molecular classification of primary breast tumors possessing distinct prognostic properties // *Hum Mol Genet.*—2002.—Vol. 11 (2).—P. 199-206.
14. Lee J.K., Havaleshko D.M., Cho H. et al. A strategy for predicting the chemosensitivity of human cancers and its application to drug discovery // *Proc Natl Acad Sci U S A.*—2007.—Vol. 104 (32).—P. 13086-13091.
15. Livasy C.A., Karaca G., Nanda R. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma // *Mod Pathol.*—2006.—Vol. 19 (2).—P. 264-271.
16. Miller L.D., Smeds J., George J. et al. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival // *Proc Natl Acad Sci U S A.*—2005.—Vol. 102 (38).—P. 13550-13555.
17. Paik S., Shak S., Tang G. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer // *N Engl J Med.*—2004.—Vol. 351 (27).—P. 2817-2826.
18. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B. et al. Molecular portraits of human breast tumours // *Nature.*—2000.—Vol. 406 (6797).—P. 747-752.
19. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // *Science.*—1995.—Vol. 270 (5235).—P. 467-470.
20. Sorlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications // *Proc Natl Acad Sci U S A.*—2001.—Vol. 98 (19).—P. 10869-10874.
21. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. // *Proc Natl Acad Sci U S A.*—2003.—Vol. 100 (14).—P. 8418-8423.
22. van 't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer // *Nature.*—2002.—Vol. 415 (6871).—P. 530-536.
23. van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer // *N Engl J Med.*—2002.—Vol. 347 (25).—P. 1999-2009.

Поступила в редакцию 18.12.2012 г.