

DOI: 10.17650/1994-4098-2023-19-1-69-81



Предиктивная 100-генная шкала. Анализ диагностической эффективности при метастатическом раке молочной железы

Р.М. Палтуев^{1, 2}, С.Н. Алексахина², А.С. Артемьева², Э.А. Байчоров³, С.Ю. Бахарев⁴, А.А. Божок⁵, В.А. Васин⁶, В.И. Владимиров⁷, О.А. Волынщикова², А.Ю. Воронцов⁸, Е.А. Гайсина⁹, А.А. Гофман⁴, Е.Н. Имянитов², В.В. Клименко², А.В. Комяхов², М.М. Константинова¹, М.В. Копп¹⁰, А.Г. Кудайбергенова², И.А. Лалак³, Д.Л. Матевосян⁸, Н.М. Муджири¹¹, О.В. Полтарева⁶, О.И. Севрюкова³, В.Ф. Семиглазов², Т.Ю. Семиглазова², М.М. Урезкова², Л.А. Чурилова⁴

¹Общероссийская общественная организация «Российское общество онкомаммологов»; Россия, 198255 Санкт-Петербург, просп. Ветеранов, 56;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

³ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер»; Россия, 355047 Ставрополь, ул. Октябрьская, 182а;

⁴КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер»; Россия, 656045 Барнаул, Змеиногорский тракт, 110к;

⁵Российско-финская клиника «Скандинавия»; Россия, 191014 Санкт-Петербург, Литейный просп., 55а, лит. А;

⁶ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер»; Россия, 153040 Иваново, ул. Любимова, 5;

⁷ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер»; Россия, 357502 Пятигорск, просп. Калинина, 31;

⁸ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер»; Россия, 603093 Нижний Новгород, ул. Деловая, 11/1;

⁹ГАУЗ ТО «Многопрофильный клинический медицинский центр «Медицинский город»; Россия, 625041 Тюмень, ул. Барнаульская, 32;

¹⁰Частное учреждение образовательная организация высшего образования «Медицинский университет «Реавиз»; Россия, 443001 Самара, ул. Чапаевская, 227;

¹¹ФГБНУ «Научный центр неврологии»; Россия, 125367 Москва, Волоколамское шоссе, 80

Контакты: Руслан Маликович Палтуев paltuev@mail.ru

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) – наиболее часто встречающееся онкологическое заболевание в женской популяции. Молекулярные методики оценки генетического профиля опухоли позволяют более точно изучить свойства опухоли индивидуально, выявить новые прогностические и предиктивные маркеры.

Цель исследования – повысить эффективность системной терапии РМЖ, снизить количество необоснованных назначений с помощью данных об индивидуальных молекулярно-генетических характеристиках опухоли, разработать мультигенную панель для обеспечения персонализированного подхода к назначению системного лечения РМЖ.

Материалы и методы. В рамках исследования в образцах опухолевой ткани (всего 84 образца) пациенток пре- и постменопаузального возраста с метастатическим РМЖ, которые наблюдались и получали лечение в 6 медицинских учреждениях, изучена экспрессия мРНК 100 генов, участвующих в развитии РМЖ.

Предварительно в качестве тестового исследования был проведен анализ архивного материала из парафиновых блоков опухолей 12 пациенток из 1216 больных с T1–2N0M0 РМЖ, включенных в ретроспективный анализ. Анализ экспрессии генов проводили с использованием технологии nCounter, основанной на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов (nCounter Analysis System компании NanoString Technologies, США). Исследуемым материалом являлись образцы опухолевой ткани (биоптаты или операционный материал). Выбор генов основан на результатах изучения данных литературы и опыта разработки других мультигенных структур, а также клинической значимости маркеров прогностических шкал. Исследования с целью подтверждения мутации генов проводили методами секвенирования нового поколения и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.

Результаты. Выполнен анализ экспрессии 28 генов с высокой предиктивной значимостью и значительным накопленным опытом изучения по данным литературы (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, *Erb2*, *EGFR*, *CDH3*, *FOX1*, *KRT14*, *KRT5*, *CD274*, *CDK4*, *CDK6*, *P53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CLDN3*, *CLDN7*, *AR*, *TOP2a*, *TUBB3*). По результатам сравнения было выявлено 29 случаев (29/84; 34,5 %) расхождения в оценке подтипа опухоли. В 11 случаях расхождения относились к люминальным А и В подтипам РМЖ, что может оказать влияние

на выбор оптимальной лекарственной терапии. В 18 случаях расхождения относились к подтипам опухоли РМЖ, для которых рекомендуются принципиально различные схемы лекарственной терапии.

Разработанная мультигенная сигнатура в рамках одного лабораторного исследования обеспечивает точное определение подтипа опухоли у пациенток с метастатическим РМЖ и выбор оптимальной тактики лекарственной терапии.

Заключение. Разработанная 100-генная сигнатура включает молекулярные подтипы РМЖ (люминальный А, люминальный В, базальный, клаудиноподобный) и лечебно-ориентированные кластеры. Молекулярно-генетическое профилирование опухоли с использованием данной мультигенной сигнатуры является точным методом определения подтипа опухоли у пациенток с РМЖ, что определяет возможность индивидуализации тактики лекарственной терапии.

Ключевые слова: мультигенная панель, мультигенная сигнатура, рак молочной железы, молекулярная диагностика, экспрессия генов

Для цитирования: Палтуев Р.М., Алексахина С.Н., Артемьева А.С. и др. Предиктивная 100-генная шкала. Анализ диагностической эффективности при метастатическом раке молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2023;19(1):69–81. DOI: 10.17650/1994-4098-2023-19-1-69-81

Predictive multigenic scale. Analysis of own results in metastatic breast cancer

R.M. Paltuev^{1,2}, S.N. Aleksakhina², A.S. Artemyeva², E.A. Baychorov³, S.Yu. Bakharev⁴, A.A. Bozhok⁵, V.A. Vasin⁶, V.I. Vladimirov⁷, O.A. Volynshchikova², A.Y. Vorontsov⁸, E.A. Gaysina⁹, A.A. Hoffman⁴, E.N. Imyanitov², V.V. Klimenko², A.V. Komyakhov², M.M. Konstantinova¹, M.V. Kopp¹⁰, A.G. Kudaybergenova², I.A. Lalak³, D.L. Matevosyan⁸, N.M. Mudzhiri¹¹, O.V. Poltareva⁶, O.I. Sevryukova³, V.F. Semiglazov², T.Yu. Semiglazova², M.M. Urezkova², L.A. Churilova⁴

¹Russian Association of Oncological Mammology; 56 Prospekt Veteranov, Saint Petersburg 198255, Russia;

²N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 68 Leningradsкая St., Pesochnyy Settlement, Saint Petersburg 197758, Russia;

³Stavropol Regional Clinical Oncological Dispensary; 182a Oktyabrskaya St., Stavropol 355047, Russia;

⁴Altai Regional Clinical Oncological Dispensary; 110k Zmeinogorskiy Trakt, Barnaul 656045, Russia;

⁵Russian-Finnish Clinic "Scandinavia"; 55a/A Liteyny Prospekt, Saint Petersburg 191014, Russia;

⁶Ivanovo Regional Oncological Dispensary; 5 Lyubimova St., Ivanovo 153040, Russia;

⁷Pyatigorsk Interdistrict Oncological Dispensary; 31 Prospekt Kalinina, Pyatigorsk 357502, Russia;

⁸Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncological Dispensary; 11/1 Delovaya St., Nizhny Novgorod 603093, Russia;

⁹Multidisciplinary Clinical Medical Center "Medical City"; 32 Barnaulskaya St., Tyumen 625041, Russia;

¹⁰Part Institution Educational Organization of Higher Education "Medical University Reaviz"; 227 Chapaevskaya St., Samara 443001, Russia;

¹¹Scientific Center of Neurology; 80 Volokolamskoe Shosse, Moscow 125367, Russia

Contacts: Ruslan Malikovich Paltuev paltuev@mail.ru

Background. Breast cancer is one of the most common female malignancies. Molecular diagnostic methods of tumor profiling allow us to analyze individual tumor characteristics, identify new prognostic and predictive markers.

Aim. To increase the efficacy of systemic therapy for breast cancer and reduce inappropriate prescriptions using the data on individual molecular tumor characteristics; to develop a polygenic panel to ensure a tailored approach to systemic therapy for breast cancer.

Materials and methods. We analyzed 84 tumor tissue samples from pre- and postmenopausal women with metastatic breast cancer who were treated and followed-up in 6 healthcare institutions. We assessed expression of genes involved in breast cancer.

In a pilot study, we analyzed archived paraffin-embedded tumor specimens from 12 out of 1,216 patients with T1–2N0M0 breast cancer included into retrospective analysis. Gene expression was assessed using the nCounter technology based on direct digital detection of targets using fluorescent barcodes (nCounter Analysis System; NanoString Technologies, USA). Tumor tissue (biopsy and surgical specimens) was analyzed. The choice of genes was based on the literature data and experience in the development of other polygenic panels, as well as clinical significance of markers of prognostic scales. Gene mutations were confirmed by next generation sequencing and reverse transcription-polymerase chain reaction.

Results. We analyzed the expression of 28 genes with a high predictive value that have been substantially studied (including *ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, *Erb2*, *EGFR*, *CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*, *KRT5*, *CD274*, *CDK4*, *CDK6*, *P53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CLDN3*, *CLDN7*, *AR*, *TOP2a*, *TUBBIII*). We identified 29 cases of discrepancy (29/84; 34.5 %) in tumor subtype, including 11 cases of luminal A and B breast cancer, which might potentially affect the choice of the treatment regimen. In 18 cases, there were some principal discrepancies in the tumor subtype that implied totally different treatment regimens.

The proposed polygenic signature allows accurate identification of the tumor subtype in patients with metastatic breast cancer and choice of an optimal treatment strategy.

Conclusion. We have developed a 100-gene signature including molecular subtypes of breast cancer (luminal A, luminal B, basal, claudin-like) and treatment-oriented clusters. Molecular tumor profiling using this polygenic signature is an accurate method for determining tumor subtype in patients with breast cancer, which enables a tailored approach to therapy.

Keywords: polygenic panel, polygenic signature, breast cancer, molecular diagnostics, gene expression

For citation: Paltuev R.M., Aleksakhina S.N., Artemyeva A.S. et al. Predictive multigenic scale. Analysis of own results in metastatic breast cancer. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy* = Tumors of female reproductive system 2023;19(1): 69–81. (In Russ.). DOI: 10.17650/1994-4098-2023-19-1-69-81

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — наиболее часто встречающееся онкологическое заболевание в женской популяции. В мире выявляется более 2 млн случаев ежегодно. В Российской Федерации, по данным последних лет, РМЖ у женского населения — ведущая онкологическая патология (20,9 %) и основная причина смертности от злокачественных новообразований (16,2 %).

Биологические свойства опухоли в рутинной практике могут оцениваться по таким морфологическим параметрам, как дифференцировка опухоли, пролиферативный статус, лимфоваскулярная инвазия. Однако существуют более точные молекулярные методики оценки генетического профиля опухоли, позволяющие изучить свойства опухоли индивидуально.

Анализ генетического материала с помощью молекулярных методик позволяет выявить новые прогностические и предиктивные маркеры, а также генные сигнатуры, которые превосходили по своей значимости стандартные рутинные методики [1]. Подобные открытия в достаточно короткие сроки формируют новые лечебные и диагностические подходы [2].

Помимо молекулярных подтипов при статистическом анализе данных генетического исследования опухолей выявлен ряд мультигенных сигнатур. Сигнатуры были выделены на основании экспрессии определенных генов в отдельных подгруппах опухолей. При анализе экспрессии комбинаций этих генов были определены исходы лечения. Мультигенные сигнатуры включают профили генов, которые позволяют прогнозировать отдаленные результаты. Другие генные сигнатуры были выделены при прогнозировании эффекта лечения и используются в качестве предиктивных маркеров. Прогностические сигнатуры — 70-генная сигнатура MammaPrint [3], 76-генная сигнатура [4], геномный индекс степени злокачественности (Genomic Grade Index, GGI) [5], шкала оценки вероятности рецидива из Oncotype DX [6]. Общая черта всех генных сигнатур — комбинации генов, позволяющие сделать прогноз, поскольку, по-видимому, биологическое поведение опухоли имеет генетические предпосылки. Описание наиболее распространенных мультигенных сигнатур приведено в таблице.

Профессиональное сообщество единодушно считает, что мультигенные прогностические тесты обеспе-

чивают полезной информацией, дополняющей традиционные клиничко-морфологические характеристики.

Цель исследования — повышение эффективности системной терапии РМЖ, снижение количества необоснованных назначений с помощью данных об индивидуальных молекулярно-генетических характеристиках опухоли на основе современных методов исследований, разработка мультигенной панели для обеспечения персонализированного подхода к назначению системного лечения РМЖ.

Материалы и методы

Молекулярно-генетические исследования образцов ткани РМЖ. В рамках данной части исследования в образцах опухолевой ткани пациенток с метастатическим РМЖ (мРМЖ) изучали экспрессию мРНК 100 генов, участвующих в развитии РМЖ.

Образцы опухолей были предоставлены ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер» (всего 84 образца). У всех пациенток было получено письменное согласие на исследование образцов опухолевой ткани. Назначение лекарственной терапии проводил лечащий врач по данным иммуногистохимического (ИГХ) исследования на основании клинических рекомендаций Минздрава России «Рак молочной железы» [7].

Предварительно в качестве тестового исследования был проведен анализ архивного материала из парафиновых блоков опухолей 12 женщин из 1216 больных с T1–2N0M0 РМЖ, включенных в ретроспективный анализ.

Анализ экспрессии генов проводили с использованием технологии nCounter, основанной на прямой цифровой детекции мишеней с помощью флуоресцентных штрих-кодов (nCounter Analysis System, NanoString Technologies, США) согласно протоколу производителя. Исследуемым материалом являлись образцы опухолевой ткани (биоптаты или операционный материал). Основные этапы технологии nCounter включают гибридизацию, пробоподготовку (отмывку

Мультигенные сигнатуры
Multigene signatures

Mammaprint (66 генов) Mammaprint (66 genes)		PAM 50 (50 генов) PAM 50 (50 genes)		Oncotype (16 генов) Oncotype (16 genes)	Endopredict (8 генов) Endopredict (8 genes)
AA555029_RC	LOC100288906	ACTR3B	KRT17	AURKA	AZGP1
ALDH4A1	LOC730018	ANLN	KRT5	BAG1	BIRC5
AP2B1	LPCAT1	BAG1	MAPT	BCL2	DHCR7
BBC3	MCM6	BCL2	MDM2	BIRC5	IL6ST
C16orf61	MELK	BIRC5	MELK	CCNB1	MGP
C20orf46	MMP9	BLVRA	MIA	CD68	RBBP8
C9orf30	MS4A7	CCNB1	MKI67	CTSL2	STC2
CCNE2	MTDH	CCNE1	MLPH	ERBB2	UBE2C
CDC42BPA	NDC80	CDC20	MMP11	ESR1	
CDCA7	NMU	CDC6	MYBL2	GRB7	
CENPA	NUSAP1	CDH3	MYC	GSTM1	
COL4A2	ORC6L	CENPF	NAT1	MKI67	
CKK	OXCT1	CEP55	NDC80	MMP11	
DHX58	PALM2	CXXC5	NUF2	MYBL2	
DIAPH3	PEC1	EGFR	ORC6L	PGR	
DTL	PITRM1	ERBB2	PGR	SCUBE2	
EBF4	PRC1	ESR1	PHGDH		
ECT2	QSOX2	EXO1	PTTG1		
EGLN1	RAB6B	FGFR4	RRM2		
ESM1	RASSF7	FOXA1	SFRP1		
EXT1	RECQL5	FOXC1	SLC39A6		
FGF18	RFC4	GPR160	TMEM45B		
FLT1	RTN4RL1	GRB7	TYMS		
GMPS	RUNDC1	KIF2C	UBE2C		
GNAZ	SCUBE2	KRT14	UBE2T		
GPR126	SERF1A				
GPR180	SLC2A3				
GSTM3	STK32B				
HRASLS	TGFB3				
IGFBP5	TSPYL5				
JHDM1D	UCHL5				
LIN9	WISP1				
LOC100131053	ZNF385B				

не связавшихся проб, иммобилизацию проб на картридже, выравнивание в электромагнитном поле), цифровой подсчет штрих-кодов, основанный на детекции отдельных флуоресцентных меток, специфически связывающихся с последовательностями РНК исследуемых проб. Преимущества данной технологии: анализ до 800 мишеней в одной пробе; не требуется предварительная обратная транскрипция и амплификация; высокая воспроизводимость результатов; автоматизированный рабочий процесс; простая обработка данных; низкая чувствительность к качеству образца. Продемонстрирована сопоставимость результатов технологии nCounter с данными количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, ИГХ-исследования и флуоресцентной гибридизации *in situ* [8].

Для получения РНК из залитых парафином образцов ткани использовали набор компании Norgen (FFPE Total RNA Purification Kit, Norgen, Канада), выделение и очистка РНК проводились согласно протоколу производителя. Технология основана на хроматографии на спин-колонок с использованием в ка-

честве сепарационной матрицы патентованной смолы Norgen. Достоинством данной методики является очистка РНК от других клеточных компонентов без использования фенола или хлороформа, наличие и недостаточная отмывка которых могут негативно сказываться при дальнейших подсчетах количества РНК. Сначала процесс включал депарафинизацию образцов ткани посредством серии промываний ксилолом и этанолом. Затем образцы ткани гидролизуют протеиназой К и буферным раствором для гидролиза А. Далее к лизату добавляли буферный раствор RL и этанол, полученный раствор загружали на спин-колонок. Смолы Norgen связывают нуклеиновые кислоты способом, который зависит от концентраций ионов. Таким образом, с колонкой связывалась только РНК, в то время как другие загрязнители удалялись с потоком или задерживались наверху смолы. Затем связанную РНК промывали прилагаемым раствором для промывания РНК А для удаления каких-либо примесей, и очищенную общую РНК элюировали раствором для элюирования А.

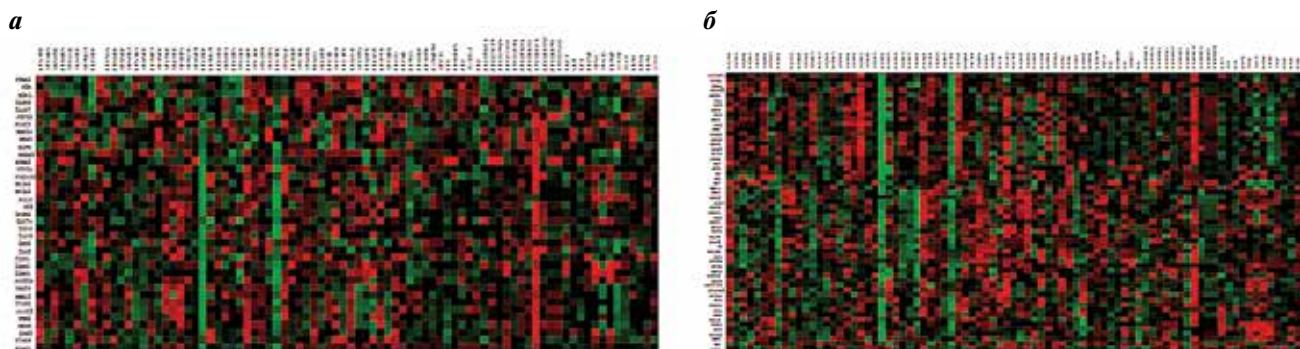


Рис. 1. Исследуемая 100-генная сигнатура для рака молочной железы: а — лечебно-ориентированная часть; б — пролиферативно-референсная часть

Fig. 1. Analyzed 100-gene signature for breast cancer: а — treatment-oriented part; б — proliferative-reference part

Состав изучаемой мультигенной сигнатуры представлен на рис. 1. Выбор генов основан на результатах изучения данных литературы и опыта разработки других мультигенных структур, а также клинической значимости маркеров прогностических шкал.

Исследования с целью подтверждения мутации генов проводили методами секвенирования нового поколения и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в научном отделе биологии опухолевого роста ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

Сравнение результатов оценки типа опухоли с помощью молекулярно-генетического анализа и ИГХ-исследования. Выполнен молекулярно-генетический анализ с использованием технологии nCounter 84 образцов опухоли пациенток пре- и постменопаузального возраста с мРМЖ, которые наблюдались и получали лечение в 6 медицинских учреждениях Российской Федерации (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер», ОБУЗ «Ивановский областной онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер», ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер»). В рамках исследования был выполнен анализ экспрессии 28 генов с высокой предиктивной значимостью и значительным накопленным опытом изучения по данным литературы (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, *Erb2*, *EGFR*, *CDH3*, *FOXCI*, *KRT14*, *KRT5*, *CD274*, *CDK4*, *CDK6*, *P53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CLDN3*, *CLDN7*, *AR*, *TOP2a*, *TUBBIII*). По результатам анализа был определен молекулярный подтип опухоли, который сравнивали с результатами, полученными при проведении ИГХ-исследования в локальной лаборатории соответствующего медицинского учреждения (суррогатный подтип). Назначение лекарственной терапии проводилось лечащим врачом по данным ИГХ-исследования на ос-

новании клинических рекомендаций Минздрава России «Рак молочной железы» [7].

В 2 направленных образцах (№№ 23, 33) был выявлен фиброз, данные образцы использовались в качестве контроля.

Перед исследованием вышеописанных образцов опухолевой ткани в качестве тестовой реакции был проведен анализ архивного материала из парафиновых блоков опухолей 12 женщин из 1216 больных с T1–2N0M0 эстроген-рецептор-положительным (ЭР+), прогестерон-рецептор-положительным (ПР+), HER2– РМЖ, включенных в ретроспективный анализ. Тепловая карта 12 больных представлена на рис. 2. Интерпретация результатов оценки подтипа опухоли по тепловой карте совпала с результатами ИГХ-исследования, что позволило перейти к исследованию образцов опухолевой ткани у пациенток с мРМЖ.

Результаты

Оценка экспрессии *ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *ERB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CD274*. Результаты оценки экспрессии 7 генов (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *ERB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CD274*), рекомендуемых для исследования клиническими рекомендациями Минздрава России [7], обобщены ниже.

Уровень экспрессии *ESR1* варьировал от 52,42 до 86467,64. При сравнительном анализе с результатами ИГХ-исследования ЭР+ статус (ИГХ) расценивался как ложноположительный в случае значений экспрессии *ESR1* от 52,42 до 3054,92 (+1), а для ЭР– статуса оценка считалась ложноотрицательной в случае значений экспрессии от 9184,07 (+2) и выше.

Уровень экспрессии *PGR* варьировал от 41,89 до 86467,64. Уровни 41,89–2058,33, которые отмечались для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», 2058,33–4002,01 – «+2», выше 4002,01 – «+3».

Уровень экспрессии *PIK3CA* варьировал от 323,59 до 3583,97. Уровни 323,59–1293,65, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали

оценке экспрессии «+1», 1293,65–2244,04 – «+2», выше 2244,04 – «+3».

Согласно действующим клиническим рекомендациям Минздрава России [7], пациенткам с гормонозависимым HER2– мРМЖ целесообразно определение мутации в гене *PIK3CA* для выбора оптимальной тактики лекарственной терапии. В связи с этим был проведен генетический анализ (полимеразная цепная реакция в реальном времени, секвенирование по Сэнгеру) 3 образцов опухолевой ткани с ЭР+, ПР+, HER2– статусом и экспрессией гена *PIK3CA* выше 2244,04, который подтвердил наличие мутации.

Уровень экспрессии *ERB2* варьировал от 252,32 до 128519,2. При сравнительном анализе с результатами ИГХ-исследования HER2+ статус (ИГХ) расценивался как ложноположительный в случае значений экспрессии *ERB2* от 252,32 до 9196,25 (+1), а для статуса HER2– оценка считалась ложноотрицательной в случае значений экспрессии от 15022,46 (+2) и выше.

Уровень экспрессии *BRCA1* варьировал от 123,8 до 3583,97. Уровни 123,8–583,77, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 583,77–1500,91 – «+2»,

выше 1500,91 – «+3». У 2 пациенток со статусом опухоли HER2– и экспрессией гена *BRCA1* выше 583,77 был проведен генетический анализ методом секвенирования нового поколения и выявлена мутация гена *BRCA1*.

Уровень экспрессии *BRCA2* варьировал от 123,8 до 3583,97. Уровни 123,8–782,16, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 782,16–1303,97 – «+2», выше 1303,97 – «+3».

Уровень экспрессии *CD274* варьировал от 36,97 до 3550,56. Уровни 36,94–500,04, наблюдаемые для большинства исследуемых образцов, соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 500,04–1100,17 – «+2», выше 1100,17 – «+3». У 3 пациенток со статусом опухоли HER2– и экспрессией гена *CD274* выше 500 по результатам ИГХ-исследования был подтвержден PD-L1-положительный статус опухоли.

Оценка экспрессии *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*. Результаты оценки экспрессии генов *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, связанных с гормоночувствительностью и гормонорезистентностью опухоли, обобщены ниже.

Уровень экспрессии *BCAR4* варьировал от 9,08 до 678,82. Уровни 9,08–214,37 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 214,37–3163,766 – «+2», выше 3163,766 – «+3».

Уровень экспрессии *BCAS2* варьировал от 1006,72 до 5511,82. Уровни 1006,72–2833,88 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 2833,88–3378,02 – «+2», выше 3378,02 – «+3».

Уровень экспрессии *CCND1* варьировал от 449,85 до 63718,82. Уровни 449,85–10324,3 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 10324,3–23160,94 – «+2», выше 23160,94 – «+3».

Уровень экспрессии *CCND2* варьировал от 438,32 до 7448,47. Уровни 438,32–2029 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 2029–3157,54 – «+2», выше 3157,54 – «+3».

Уровень экспрессии *CCND3* варьировал от 173,68 до 6763,5. Уровни 173,68–1518,29 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1518,29–2087,82 – «+2», выше 2087,82 – «+3».

Уровень экспрессии *FOXA1* варьировал от 38,17 до 133744,09. Уровни 38,17–22839,1 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 22839,1–33634,59 – «+2», выше 33634,59 – «+3».

Оценка экспрессии *EGFR*, *CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*, *KRT5*. Результаты оценки экспрессии генов *EGFR*, *CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*, *KRT5*, повышенная экспрессия которых является маркером базального РМЖ, обобщены ниже.

Уровень экспрессии *EGFR* варьировал от 36,97 до 11125,56. Уровни 36,97–1031,04 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1031,04–2843,17 – «+2», выше 2843,17 – «+3».

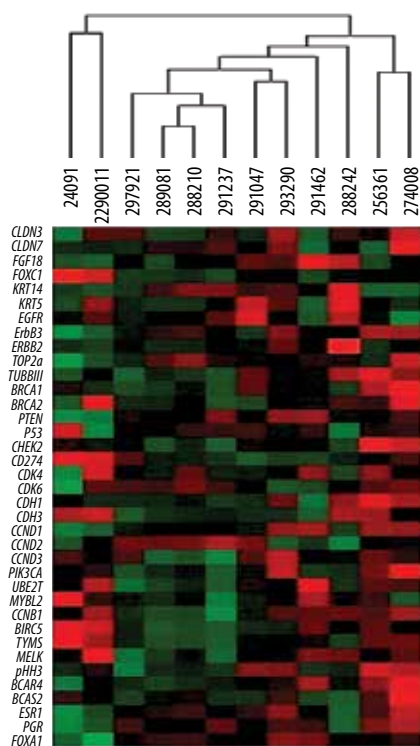


Рис. 2. Тепловая карта: тестовая реакция у 12 пациенток с T1–2N0M0 эстроген-рецептор-положительным, прогестерон-рецептор-положительным, HER2– раком молочной железы (анализ архивного материала). Цветовой показатель соответствует числовому значению для каждого маркера

Fig. 2. Heatmap: pilot study in 12 patients with T1–2N0M0 estrogen receptor-positive, progesterone receptor-positive, HER2– breast cancer (analysis of archived material). Color indicates the value of each parameter

Уровень экспрессии *CDH3* варьировал от 27,39 до 7231,56. Уровни 27,39–1064,04 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1064,04–2820,59 – «+2», выше 2820,59 – «+3».

Уровень экспрессии *FOXC1* варьировал от 30,79 до 8867,77. Уровни 30,97–1121,59 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1121,59–2129,13 – «+2», выше 2129,13 – «+3».

Уровень экспрессии *KRT14* варьировал от 2,87 до 56567,54. Уровни 2,87–3087,84 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 3087,84–17911,44 – «+2», выше 17911,44 – «+3».

Уровень экспрессии *KRT5* варьировал от 1,15 до 20332,77. Уровни 1,15–1121,59 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни до 2129,13 – «+2», выше 2129,13 – «+3».

Оценка экспрессии *CDK4*, *CDK6*. Результаты оценки экспрессии генов *CDK4*, *CDK6* (иммуномодуляторный РМЖ) обобщены ниже.

Уровень экспрессии *CDK4* варьировал от 813,2 до 15607,49. Уровни 813,2–2875,81 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 2875,81–4458,03 – «+2», выше 4458,03 – «+3».

Уровень экспрессии *CDK6* варьировал от 250,51 до 9736,2. Уровни 250,51–1878,93 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1878,93–4458,03 – «+2», выше 4458,03 – «+3».

Оценка экспрессии *P53*, *PTEN*, *CHEK2*. Результаты оценки экспрессии генов *P53*, *PTEN*, *CHEK2*, связанных с развитием наследственной формы РМЖ, обобщены ниже.

Уровень экспрессии *P53* варьировал от 208,83 до 9742,76. Уровни 208,83–2485,77 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 2485,77–3864,35 – «+2», выше 3864,35 – «+3».

Уровень экспрессии *PTEN* варьировал от 1064,64 до 27368,31. Уровни 1064,64–10455,52 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 10455,52–14492,47 – «+2», выше 14492,47 – «+3».

Уровень экспрессии *CHEK2* варьировал от 127,47 до 3589,97. Уровни 127,47–693,24 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 693,24–1001,47 – «+2», выше 1001,47 – «+3».

Оценка экспрессии *AR*. Уровень экспрессии *AR* варьировал от 28,9 до 18115,38. Уровни 28,9–1770,44 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1770,44–4113,61 – «+2», выше 4113,61 – «+3».

Оценка экспрессии *CLDN3*, *CLDN7*. Повышенная экспрессия генов *CLDN3*, *CLDN7* обуславливает наличие клаудиноподобного РМЖ. Уровень экспрессии *CLDN3* варьировал от 40,81 до 21225,17. Уровни 40,81–5104,86 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 5104,86–7700,96 – «+2», выше 7700,96 – «+3».

Уровень экспрессии *CLDN7* варьировал от 66,7 до 48720,61. Уровни 66,7–6543,89 соответствовали

оценке экспрессии «+1», уровни 6543,89–11029,96 – «+2», выше 11029,96 – «+3».

Оценка экспрессии *TOP2a*, *TUBBIII*. Результаты оценки экспрессии генов *TOP2a*, *TUBBIII*, отвечающих за чувствительность к химиотерапии антрациклинами и таксанами, обобщены ниже.

Уровень экспрессии *TOP2a* варьировал от 454,33 до 4080,08. Уровни 454,33–1851,11 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 1851,11–2292,96 – «+2», выше 2292,96 – «+3».

Уровень экспрессии *TUBBIII* варьировал от 25,71 до 3583,97. Уровни 25,71–1523,89 соответствовали оценке экспрессии «+1», уровни 523,89–811,03 – «+2», выше 811,03 – «+3».

По результатам сравнения было выявлено 29 случаев (29/84; 34,5 %) расхождения оценки подтипа опухоли. В 11 случаях (образцы №№ 2, 8, 14, 21, 24, 40, 41, 52, 58, 70, 77) расхождения относились к люминальным А и В подтипам РМЖ, что может оказать влияние на выбор оптимальной лекарственной терапии, однако при любой тактике назначенное лечение будет соответствовать утвержденным клиническим рекомендациям [7]. В 18 случаях (образцы №№ 4, 9, 15, 16, 25, 34, 35, 37, 38, 45, 47, 53, 57, 65, 76, 78, 80, 83) расхождения относились к подтипам опухоли РМЖ, для которых рекомендуются принципиально различные схемы лекарственной терапии [7].

Таким образом, разработанная мультигенная сигнатура в рамках одного лабораторного исследования обеспечивает точное определение подтипа опухоли у пациенток с мРМЖ и выбор оптимальной тактики лекарственной терапии.

Обсуждение

Одним из актуальных вопросов современной онкологии является проблема прогнозирования течения и исхода злокачественных новообразований с целью предсказания развития прогрессирования заболевания и проведения коррекции противоопухолевой терапии. Важным направлением в исследованиях является поиск новых, более точных и достоверных способов прогноза, основанных на оценке не единичного фактора прогноза, а совокупности нескольких различных клинических, биологических, морфологических, иммунологических и других факторов и определении прогностической значимости каждого из них [5, 9–12].

Экспрессия гена – технический термин, обозначающий активность гена. Активность оценивается с помощью подсчета молекул мРНК в определенном типе клеток или ткани. Экспрессия всех генов в конкретном образце называется генетическим профилем (генной сигнатурой, генетическим портретом), большинство опухолей демонстрируют определенные профили экспрессии, связанные со специфическими биологическими свойствами [13, 14].

Молекулярная и иммуногистохимическая классификации совпадают лишь частично. Методики, позволяющие более точно определять принадлежность опухоли к тому или иному молекулярному подтипу, постоянно совершенствуются как для фундаментальных исследований, так и для рутинных клинических потребностей.

Выделение молекулярных подтипов прежде всего имеет клиническое значение. Классификация используется как для формирования прогноза у каждого конкретного пациента, так и для выбора адъювантной терапии или метода лечения диссеминированной болезни.

G. Viale и соавт. оценили корреляцию между результатами определения мРНК ЭР, ПР, HER2 с помощью методики TargetPrint, результатами стандартного ИГХ-исследования и флуоресцентной гибридизации *in situ* у 800 пациентов, принявших участие в исследовании MINDACT [15]. В исследование были включены пациенты со стадией T1–2 или резектабельной стадией T3, количеством пораженных лимфатических узлов от 0 до 3. Для ЭР частота совпадения положительных результатов, полученных с помощью теста TargetPrint и при стандартной оценке, составила 98 %, частота совпадения отрицательных результатов – 96 %. При оценке ПР частота совпадения положительных результатов составила 83 %, отрицательных результатов – 92 %. При оценке HER2 частота совпадения положительных результатов составила 75 %, отрицательных результатов – 99 %. Частота несовпадения результатов составила 6,7 % для ЭР, 12,9 % для ПР, 4,3 % для HER2. Результаты оценки с помощью микрочипа TargetPrint в значительной степени совпадают с результатами стандартного ИГХ-исследования и флуоресцентной гибридизации *in situ* в исследовании MINDACT. Следовательно, методика TargetPrint является надежным методом анализа экспрессии данного рецептора и может повышать надежность результатов определения экспрессии ЭР, ПР, HER2 [15].

В рамках определения подтипов РМЖ с помощью ИГХ-методов наиболее остро стоит вопрос о базальноподобном РМЖ. Несмотря на то, что ТНРМЖ характеризуется отсутствием экспрессии ЭР, ПР, HER2, консенсус по вопросу об использовании суррогатных ИГХ-маркеров для диагностики базальноподобного рака не достигнут. ТНРМЖ и базальноподобный РМЖ характеризуются неблагоприятным прогнозом, и выбор вариантов лечения для них невелик. Различные ИГХ-маркеры использовались для определения базального фенотипа: отсутствие экспрессии ЭР, ПР, HER2, экспрессия 1 или более базальных цитокератинов (СК5/6, СК14, СК17); для ТНРМЖ – экспрессия СК5/6 и/или EGFR [16–18]. Сравнительных исследований базальноподобного подтипа на основании генетического профиля экспрессии и ТНРМЖ, подтвержден-

ного ИГХ-методами, недостаточно. Базальноподобный подтип встречается в 15–20 % случаев во всех исследованиях. Таким образом, относительно редкая частота затрудняет достижение консенсуса. F.M. Blows и соавт. провели метаанализ более чем 10 000 случаев РМЖ и продемонстрировали наибольшую эффективность использования 5 маркеров для определения молекулярных подтипов РМЖ, включая базальноподобный [19]. В ряде исследований продемонстрирован более неблагоприятный прогноз при базальноподобном подтипе, чем при ТНРМЖ [16, 20, 21].

Тактика терапии при ТНРМЖ долгое время оставалась неопределенной, однако результаты недавнего метаанализа подтверждают эффективность платино-содержащей терапии по сравнению со схемами без препаратов платины по показателям частоты полной патологической ремиссии (pCR), объективного общего ответа, выживаемости без прогрессирования, безрецидивной и общей выживаемости у пациенток с ТНРМЖ без мутации *BRCA*, что подтверждает важность профилирования опухоли для индивидуализации лечения [22]. В исследовании, выполняемом с использованием сигнатуры PAM50, было показано преимущество карбоплатина против доцетаксела по параметру объективного общего ответа при базальноподобном ТНРМЖ с герминальной мутацией *BRCA1*, при этом доцетаксел показал более высокую эффективность в подгруппе пациенток с небазальноподобным ТНРМЖ [22].

Результаты недавних клинических исследований позволяют индивидуализировать назначение терапии при выявлении мутаций генов *BRCA1/2*. В исследовании III фазы OlympiA с включением 1836 больных с ранним РМЖ, выявленными патогенными мутациями генов *BRCA1/2* и высоким риском рецидива на промежуточном анализе после 2,5 года наблюдения было показано, что при терапии олапарибом в дозе 300 мг 2 раза в день в течение 1 года после полностью завершеного локального и системного лечения (неоадъювантной и/или адъювантной химиотерапии) 3-летняя выживаемость без инвазивных заболеваний составила 85,9 % в группе олапариба и 77,1 % в группе плацебо (разница 8,8 %; 95 % доверительный интервал (ДИ) 4,5–13,0; отношение рисков (ОР) для инвазивного заболевания или смерти 0,58; 99,5 % ДИ 0,41–0,82; $p < 0,001$). Трехлетняя выживаемость без отдаленного заболевания составила 87,5 % в группе олапариба и 80,4 % в группе плацебо (разница 7,1 %; 95 % ДИ 3,0–11,1; ОР для отдаленного заболевания или смерти 0,57; 99,5 % ДИ 0,39–0,83; $p < 0,001$). Профиль безопасности олапариба соответствовал ранее полученным данным [23]. Кроме того, показана эффективность олапариба при наличии мутаций *gPALB2* [24]. В исследовании EMBRACA талазопариб оказался более эффективным, чем терапия по выбору врача, у пациентов

с мРМЖ и мутацией гена *BRCA*. Выживаемость без прогрессирования составила 8,6 и 5,6 мес в группах талазопагиба и химиотерапии соответственно (ОР 0,54; 95 % ДИ 0,41–0,71; $p < 0,0001$) [8, 25].

Исследование II фазы TBCRC 048 показало эффективность терапии олапарибом при герминальной мутации *PALB2* и соматической мутации *BRCA1/2* [24]. В настоящее время популяция пациентов, которые могут получить пользу от PARPi, выходит за рамки носителей мутации *gBRCA1/2* и включает пациентов с мутациями *gPALB2* и *sBRCA1/2*.

По данным метаанализа, проведенного в 2018 г., высокая экспрессия *EGFR* обнаруживается у 27 % пациентов с ранним РМЖ. У больных ТНРМЖ с гиперэкспрессией *EGFR* показатели безрецидивной и общей выживаемости были существенно ниже в сравнении с ТНРМЖ без гиперэкспрессии *EGFR* [26].

В течение последних лет проводятся исследования по изучению анти-EGFR-препаратов при РМЖ, в частности ингибиторов тирозинкиназы, однако препараты, одобренные для применения в рутинной клинической практике, отсутствуют [27].

Высокая экспрессия гена *CD274*, отвечающего за синтез PD-L1, обуславливает необходимость назначения атезолизумаба (препарата анти-PD-L1-моноклональных антител) [7].

Недавние результаты исследования KEYNOTE-355 продемонстрировали эффективность комбинации химиотерапии с препаратом анти-PD-L1-моноклональных антител пембролизумабом у пациентов с распространенным ТНРМЖ с PD-L1-положительным статусом (combined positive score (CPS) > 10), определенным с помощью теста DACO 22C3 [28].

Согласно рекомендациям NCCN 2022 [29] и ASCO/CAP 2020 [30], пациентки с низким уровнем экспрессии ЭР (1–10 %) могут получить эффект от эндокринной терапии, однако биологическое поведение некоторых карцином с низкой экспрессией ЭР более схоже с таковым ЭР-карцином, поэтому этот результат в настоящее время следует считать сомнительным, течение заболевания более близко к таковому при ЭР-РМЖ, что должно учитываться при выборе лечебной стратегии.

В исследовании B.S. Sheffield и соавт. [31] в группе ЭР (1–10 %), по результатам PAM50, люминальный HER2-рак составляет только 10 %, базальный и HER2+ подтипы – 90 %. Эти результаты существенно не отличаются от доли люминальных подтипов, выявленных в когорте ИГХ ЭР-опухолей молочной железы (5 % люминальных, 95 % нелюминальных). Показатели безрецидивной и общей выживаемости были одинаковыми в обеих группах ($p = 0,4$ и $0,5$ соответственно), несмотря на адъювантную гормональную терапию, назначенную в большинстве (59 %) слабopоложительных случаев ЭР. В ретроспективном исследовании

М. Yi и соавт. [32] на основании анализа данных 9369 больных РМЖ также были получены результаты, свидетельствующие о неэффективности гормонотерапии как у пациенток с низкой экспрессией ЭР, так и у пациенток с ЭР-статусом.

При РМЖ примерно 70 % опухолей экспрессируют ЭР, что обуславливает их чувствительность к гормональному воздействию. Гормонотерапия – важный метод лечения как резектабельного, так и диссеминированного РМЖ. Существует ряд механизмов развития резистентности к гормонотерапии. Актуальные исследования свидетельствуют о том, что ключевую роль в развитии резистентности играет мутация гена ЭР *ESR1*. Большинство мутаций этого гена (80 %) располагаются в зоне лигандсвязывающего домена, включающего кодоны 534–538: D538G, Y537N/C/S, E380Q [33, 34]. Данные мутации являются приобретенными, практически полностью отсутствуют при первичном РМЖ (< 2 % случаев) и возникают в метастатических опухолях у 25–30 % пациентов на фоне терапии ингибиторами ароматазы. На первый взгляд, данная мутация может быть маркером резистентности к ингибиторам ароматазы. Однако результаты исследований свидетельствуют о том, что выявление мутации *ESR1* является независимым фактором неблагоприятного прогноза в отношении как безрецидивной, так и общей выживаемости.

Итак, резистентность к гормонотерапии остается серьезной клинической проблемой. Она развивается примерно у 20 % пациентов с ранними стадиями РМЖ, что приводит к прогрессированию заболевания уже на фоне адъювантной гормонотерапии или после ее завершения.

Масштабные генетические исследования, такие как «Атлас ракового генома» (The Cancer Genome Atlas), способствовали обновлению представлений о генетической основе РМЖ [35].

Несмотря на ключевую роль ЭР в развитии люминального РМЖ, мутации гена *ESR1* возникают только лишь в 0,5 % случаев, амплификации гена *ESR1* встречаются в 2,6 % случаев. Методом цифровой полимеразной цепной реакции при исследовании 270 случаев раннего РМЖ T. Takeshita и соавт. установили, что частота мутации *ESR1* составляет 2,5 % [36]. P. Wang и соавт. заявили о более высокой частоте – 7 % [37].

R. Jeselsohn и соавт. сравнили частоту мутаций при мРМЖ и ЭР+ раннем РМЖ. Частота мутаций всех исследованных генов при мРМЖ и раннем РМЖ была одинаковой, за исключением гена *ESR1*. Это позволяет предположить, что данная мутация играет важную роль в развитии метастатической болезни [33].

Оценка мутации *PIK3CA* позволяет индивидуализировать тактику лечения пациенток с РМЖ. Результаты III фазы рандомизированного исследования SOLAR-1 продемонстрировали преимущество комбинации

алпелисиба с фулвестрантом по сравнению с монотерапией фулвестрантом у пациентов с распространенным РМЖ HR+/HER2– с наличием мутации *PIK3CA* в опухоли, выразившееся в увеличении медианы выживаемости без прогрессирования (11,0 мес против 5,7 мес, $p < 0,001$), увеличении частоты объективных ответов (26,6 % против 12,8 %), в том числе и у пациентов с измеряемыми очагами (35,7 % против 16,2 %). Комбинация алпелисиба с фулвестрантом показала значимую эффективность по сравнению с одним фулвестрантом в 1–2-й линии терапии, в том числе у пациенток, получавших лечение CDK4/6-ингибиторами [38].

HER2+ РМЖ характеризуется экспрессией при ИГХ-исследовании либо амплификацией при гибридизации *in situ*. Гиперэкспрессия HER2 – показание к применению анти-HER2-терапии.

Регистрация и внедрение в клиническую практику препаратов из группы конъюгатов моноклональных антител (antibody-drug conjugates, ADC), демонстрирующих эффективность при низком уровне экспрессии HER2, обуславливают важность точного определения HER2-статуса опухоли. В исследовании DESTINY-Breast04 [39] трастузумаб дерукстекан (ADC-препарат) продемонстрировал снижение риска прогрессирования заболевания или смерти на 50 % (ОР 0,50; 95 % ДИ 0,40–0,63; $p < 0,0001$) у пациентов с HER2-слабоположительным мРМЖ как с положительным, так и с отрицательным статусом гормональных рецепторов. В группе трастузумаб дерукстекана медиана выживаемости без прогрессирования составила 9,9 мес по сравнению с 5,1 мес в группе химиотерапии. При применении трастузумаба дерукстекана, по сравнению с химиотерапией, наблюдалось статистически значимое уменьшение риска смерти (ОР 0,64; 95 % ДИ 0,49–0,84; $p = 0,001$), при этом медиана общей выживаемости составила 23,4 и 16,8 мес соответственно.

Сведения об индивидуальном профиле опухоли расширяют представления о гетерогенности опухолевого процесса, позволяют проводить сбор данных предиктивной и прогностической значимости отдельных биомаркеров и формировать базу для развития персонализированного подхода терапии РМЖ.

Представляются целесообразными продолжение исследований разработанных прогностических шкал и накопление данных рутинной клинической практики о группах риска больных РМЖ, выборе терапии и оценке ее эффективности.

Заключение

Изучение данных литературы и выполненные работы по оценке клинической значимости маркеров прогностических шкал позволили разработать 100-генную сигнатуру, включающую молекулярные подтипы РМЖ (люминальный А, люминальный В, базальный,

клаудиноподобный) и лечебно-ориентированные кластеры. Мультигенная сигнатура состоит из пролиферативно-референсной части (58 генов), лечебно-ориентированной части (37 генов) и референса (5 генов).

В рамках исследования сравнивали молекулярный подтип опухоли, определенный с помощью разработанной мультигенной сигнатуры, и результаты, полученные при проведении ИГХ-исследования. Молекулярно-генетический анализ с использованием технологии nCounter 84 образцов опухоли пациенток пре- и постменопаузального возраста с мРМЖ, в рамках которого была проведена оценка экспрессии 28 генов с высокой предиктивной значимостью (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, *ERBB2*, *EGFR*, *CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*, *KRT5*, *CD274*, *CDK4*, *CDK6*, *P53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CLDN3*, *CLDN7*, *AR*, *TOP2a*, *TUBBIII*), выявил 29 случаев (29/84; 34,5 %) расхождения оценки подтипа опухоли в сравнении с результатами ИГХ-исследования, из них в 18 случаях (18/84; 21 %) расхождения относились к подтипам опухоли РМЖ, для которых рекомендуются принципиально различные схемы химиотерапии.

Изучение образцов опухолевой ткани с использованием технологии nCounter позволило описать для каждого из выбранных 28 генов уровни экспрессии, соответствующие оценкам «+1», «+2» и «+3». Исследуемый перечень генов включал:

- 7 генов, рекомендуемых для исследования клиническими рекомендациями Минздрава России (*ESR1*, *PGR*, *PIK3CA*, *ERBB2*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CD274*) [7];
- гены *BCAR4*, *BCAS2*, *CCND1*, *CCND2*, *CCND3*, *FOXA1*, связанные с гормоночувствительностью и гормонорезистентностью опухоли;
- гены *EGFR*, *CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*, *KRT5*, повышенная экспрессия которых является маркером базального РМЖ;
- гены *CDK4*, *CDK6* (иммуномодуляторный РМЖ);
- гены *P53*, *PTEN*, *CHEK2*, связанные с развитием наследственной формы РМЖ;
- ген *AR*;
- гены *CLDN3*, *CLDN7* (клаудиноподобный РМЖ);
- гены *TOP2a*, *TUBBIII*, отвечающие за чувствительность опухоли к химиотерапии антрациклинами и таксанами.

Кроме того, выполненные работы позволили установить для генов *ESR1* и *ERBB2* диапазоны уровней экспрессии, соответствующие ложноположительным и ложноотрицательным результатам ИГХ-исследований статуса опухоли в отношении ЭР и HER2-рецепторов, что позволяет обеспечить выбор оптимальной тактики лечения.

В настоящем исследовании была показана сопоставимость результатов определения экспрессии генов с использованием технологии nCounter с данными

генетического исследования на мутации соответствующего гена. Так, в образцах опухолевой ткани с высокой экспрессией генов *PIK3CA* и *BRCA1* генетические анализы с использованием методов полимеразной цепной реакции в реальном времени и секвенирования нового поколения подтвердили наличие соответствующих мутаций. В образцах с высокой экспрессией гена *CD274* ИГХ-анализ подтвердил PD-L1+ статус опухоли. Полученные результаты согласуются с данными других работ, в которых также была продемонстрирована сопоставимость результатов технологии nCounter с данными количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, ИГХ-исследования и флуоресцентной гибридизации *in situ* [8].

Изучение индивидуальных молекулярно-генетических профилей опухолевых образцов, имеющих одинаковый суррогатный подтип по данным ИГХ-анализа (HER2–, ЭР+ статус и HER2– и ЭР– статус), выявило случаи клинически значимых различий характеристик опухоли, несмотря на сходный результат оценки на основании ИГХ-анализа. В опухолевых образцах с HER2–,

ЭР+ статусом индивидуальные характеристики опухоли включали более высокую экспрессию *ESR1* и маркеров неблагоприятного прогноза (*PIK3CA*, *P53*, *CCND1*, *BCAS2*, *FOXA1*), а в образцах с HER2– и ЭР– статусом – гиперэкспрессию генов *KRT5* и *CDH3*, являющихся маркером базального РМЖ; гиперэкспрессию генов *EGFR* и *CD274*, требующих соответствующей лечебной тактики с назначением анти-EGFR-препаратов и анти-PD-L1-моноклональных антител; повышенную экспрессию маркеров базального РМЖ (*CDH3*, *FOXC1*, *KRT14*) и клаудиноподобного РМЖ (*CLDN3*, *CLDN7*), обуславливающих более агрессивное течение РМЖ; повышенную экспрессию генов *TOP2α* и *TUBBIII*, которые могут служить маркерами чувствительности к антрациклиновым антибиотикам и таксанам.

Таким образом, молекулярно-генетическое профилирование опухоли с использованием разработанной мультигенной сигнатуры является точным методом определения подтипа опухоли у пациенток с РМЖ, что определяет возможность индивидуализации тактики лекарственной терапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Van de Vijver M.J. Molecular tests as prognostic factors in breast cancer. *Virchows Arch* 2014;464(3):283–91. DOI: 10.1007/s00428-014-1539-0
2. Wilson F.R., Coombes M.E., Wylie Q. et al. Herceptin® (trastuzumab) in HER2-positive early breast cancer: protocol for a systematic review and cumulative network meta-analysis. *Syst Rev* 2017;1(6):196. DOI: 10.1186/s13643-017-0588-2
3. Brandão M., Pondé N., Piccart-Gebhart M. Mammprint™: a comprehensive review. *Future Oncol* 2019;2(15):207–24. DOI: 10.2217/fon-2018-0221
4. Wang Y., Klijn J.G.M., Zhang Y. et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 2005;366(9365):671–9. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)17947-1
5. Sotiriou C., Neo S.-Y., McShane L.M. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(10):10393–8. DOI: 10.1073/pnas.1732912100
6. Paik S., Shak S., Tang G. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351(21):2817–26. DOI: 10.1056/NEJMoa041588
7. Рак молочной железы: клинические рекомендации. М.: Минздрав России, 2021. Доступно по: https://apicr.minzdrav.gov.ru/api.ashx?op=GetClinrecPdf&id=379_4.
8. Breast cancer: clinical recommendations. Moscow: Ministry of Health of Russia; 2021. Available at: https://apicr.minzdrav.gov.ru/api.ashx?op=GetClinrecPdf&id=379_4. (In Russ.)
9. Hurvitz S.A., Gonçalves A., Ruqo H.S. Talazoparib in patients with a germline *BRCA*-mutated advanced breast cancer: detailed safety analyses from the phase III EMBRACA Trial. *Oncologist* 2020;25(3):439–50. DOI: 10.1634/theoncologist.2019-0493
10. Семиглазов В.Ф., Палтуев Р.М., Семиглазов В.В. и др. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы St. Gallen 2015, адаптированные экспертами Российского общества онкоммаммологов. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2015;11(3):43–60.
11. Semiglazov V.F., Paltuev R.M., Semiglazov V.V. et al. General recommendations for the treatment of early breast cancer St. Gallen 2015, adapted by the experts of the Russian Society of Mammary Oncologists. *Opukholy zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of female reproductive system* 2015;11(3):43–60. (In Russ.)
12. Perez E.A. Abstract S1-06: Stromal tumor-infiltrating lymphocytes (S-TILs) in the alliance N9831 trial S-TILs are associated with chemotherapy benefit but not associated with trastuzumab benefit. *Cancer Res* 2015;9(75 Suppl):S1-06-S1-06.
13. Sørlie T., Perou C.M., Tibshirani R. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(19):10869–74. DOI: 10.1073/pnas.191367098
14. Sparano J.A. TAILORx: trial assigning individualized options for treatment (Rx). *Clin Breast Cancer* 2006;4(7):347–50. DOI: 10.3816/CBC.2006.n.051
15. Bertucci F., Finetti P., Cervera N. Gene expression profiling and clinical outcome in breast cancer. *J Int Biology* 2006;4(10):429–43. DOI: 10.1089/omi.2006.10.429
16. Cowin P.A., Anglesio M., Etemadmoghadam D. Profiling the cancer genome. *Ann Rev Gen Hum Genet* 2010;11:133–59. DOI: 10.1146/annurev-genom-082509-141536
17. Viale G., Slaets L., Bogaerts J. et al. High concordance of protein (by IHC), gene (by FISH; HER2 only), and microarray readout (by TargetPrint) of ER, PgR, and HER2: results from the EORTC 10041/BIG 03-04 MINDACT trial. *Ann Oncol* 2014;25(25):816–23.
18. Nielsen T.O., Hsu F.D., Jensen K. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(16):5367–74. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0220
19. Cheang M.C.U., Chia S.K., Voduc D. Ki-67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(10):736–50. DOI: 10.1093/jnci/djp082
20. Livasy C.A., Karaca G., Nanda R. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(2):264–71. DOI: 10.1038/modpathol.3800528

19. Blows F.M., Driver K.E., Schmidt M.K. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010;5(7):e1000279. DOI: 10.1371/journal.pmed.1000279
20. Rakha E.A., Elsheikh S.E., Aleskandarany M.A. et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res* 2009;7(15):2302–10. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2132
21. Cheang M.C.U., Chia S.K., Voduc D. Ki-67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2009;101(10):736–50. DOI: 10.1093/jnci/djp082
22. Lin C., Cui J., Peng Z. et al. Efficacy of platinum-based and non-platinum-based drugs on triple-negative breast cancer: meta-analysis. *Eur J Med Res* 2022;27(1):201. DOI: 10.1186/s40001-022-00839-0
23. Tutt A.N.J., Garber J.E., Kaufman B. et al. Adjuvant olaparib for patients with *BRCA1*- or *BRCA2*-mutated breast cancer. *N Engl J Med* 2021;384(25):2394–405. DOI: 10.1056/NEJMoa2105215
24. Tung N.M., Robson M.E., Venz S. et al. TBCRC 048: phase II study of olaparib for metastatic breast cancer and mutations in homologous recombination-related genes. *J Clin Oncol* 2020;38(36):4274–82. DOI: 10.1200/JCO.20.02151
25. Litton J.K., Hurvitz S.A., Mina L.A. Talazoparib *versus* chemotherapy in patients with germline *BRCA1/2*-mutated HER2-negative advanced breast cancer: final overall survival results from the EMBRACA trial. *Ann Oncol* 2020;31(11):1526–35. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.08.2098
26. Gonzalez-Conchas G.A., Rodriguez-Romo L., Hernandez-Barajas D. et al. Epidermal growth factor receptor overexpression and outcomes in early breast cancer: A systematic review and a meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2018;62:1–8. DOI: 10.1016/j.ctrv.2017.10.008
27. Iancu G., Serban D., Badiu C.D. et al. Tyrosine kinase inhibitors in breast cancer (review). *Exp Ther Med* 2022;23(2):114. DOI: 10.3892/etm.2021.11037
28. Cortés J., Cescon D.W., Rugo H.S. et al. Final results of KEYNOTE-355: Randomized, double-blind, phase 3 study of pembrolizumab + chemotherapy vs placebo + chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer. 2021 San Antonio Breast Cancer Symposium. Abstr. GS1-02.
29. Breast Cancer. Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20(6):691–722. DOI: 10.6004/jnccn.2022.0030
30. Allison K.H., Hammond M.E.H., Dowsett M. et al. Estrogen and progesterone receptor testing in breast cancer: ASCO/CAP guideline update. *J Clin Oncol* 2020;38(12):1346–66. DOI: 10.1200/JCO.19.02309
31. Sheffield B.S., Kos Z., Asleh-Aburaya K. et al. Molecular subtype profiling of invasive breast cancers weakly positive for estrogen receptor. *Breast Cancer Res Treat* 2016;155(3):483–90. DOI: 10.1007/s10549-016-3689-z
32. Yi M., Huo L., Koenig K.B. et al. Which threshold for ER positivity? A retrospective study based on 9639 patients. *Ann Oncol* 2014;25(5):1004–11. DOI: 10.1093/annonc/mdl053
33. Jeselsohn R., Yelensky R., Buchwalter G. et al. Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2014;7(20):1757–67. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2332
34. Jeselsohn R., Buchwalter G., De Angelis C. et al. *ESR1* mutations – a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;10(12):573–83. DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.117
35. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;7418(490):61–70. DOI: 10.1038/nature11412
36. Takeshita T., Yamamoto Y., Yamamoto-Ibusuki M. et al. Droplet digital polymerase chain reaction assay for screening of *ESR1* mutations in 325 breast cancer specimens. *Transl Res* 2015;6(166):540–553.e2. DOI: 10.1016/j.trsl.2015.09.003
37. Wang P., Bahreini A., Gyanchandani R. et al. Sensitive detection of mono- and polyclonal *ESR1* mutations in primary tumors, metastatic lesions, and cell-free DNA of breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2016;5(22):1130–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1534
38. André F., Ciruelos E., Rubovszky G. et al. Alpelisib for *PIK3CA*-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2019;380(20):1929–40. DOI: 10.1056/NEJMoa1813904
39. Modi Sh., Jacot W., Yamashita T. et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-low advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2022;387(1):9–20. DOI: 10.1056/NEJMoa2203690

Благодарность. Авторы выражают благодарность за поддержку исследования профессору, директору ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России Беляеву Алексею Михайловичу; к.м.н., главному врачу ГБУЗ НО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер» Гамаюнову Сергею Викторовичу; д.м.н., главному врачу КГБУЗ «Алтайский краевой онкологический диспансер» Вихлянову Игорю Владиславовичу; к.м.н., главному врачу ОБУЗ ИО «Ивановский областной онкологический диспансер» Козлову Владимиру Александровичу; главному врачу ГБУЗ СК «Пятигорский межрайонный онкологический диспансер» Чистякову Валерию Михайловичу; главному врачу ГБУЗ СК «Ставропольский краевой клинический онкологический диспансер» Хурцеву Константину Владимировичу.

Acknowledgements. We thank Professor A.M. Belyaev, director of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; S.V. Gamayunov, PhD, MD, chief doctor of Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncological Dispensary; I.V. Vikhlyanov, PhD, MD, DSc, chief doctor of Altai Regional Clinical Oncological Dispensary; V.A. Kozlov, PhD, MD, chief doctor of Ivanovo Regional Oncological Dispensary; V.M. Chistyakov, chief doctor of Pyatigorsk Interdistrict Oncological Dispensary; K.V. Khurtsev, chief doctor of Stavropol Regional Clinical Oncological Dispensary.

Вклад авторов

Р.М. Палтуев: разработка дизайна исследования, сбор данных для анализа, анализ полученных данных, написание статьи;
А.С. Артемьева, С.Ю. Бахарев, О.И. Севрюкова, М.М. Урезкова: проведение иммуногистохимических исследований;
С.Н. Алексахина, Е.Н. Имянитов, Н.М. Муджири: проведение молекулярно-генетических исследований;
А.Г. Кудайбергенова: проведение иммуногистохимических исследований, сбор и анализ данных;
Э.А. Байчоров, А.А. Божок, В.А. Васин, В.И. Владимиров, О.А. Волынщикова, А.Ю. Воронцов, Е.А. Гайсина, А.А. Гофман, В.В. Клименко, А.В. Комяхов, М.М. Константинова, М.В. Копп, И.А. Лалак, Д.Л. Матевосян, О.В. Полтарева, В.Ф. Семиглазов, Т.Ю. Семиглазова, Л.А. Чурилова: сбор и анализ данных.

Authors' contributions

R.M. Paltuev: developing the study design, collecting and analyzing the data, writing the article;
A.S. Artemyeva, S.Yu. Bakharev, O.I. Sevryukova, M.M. Urezkova: performing immunohistochemical examinations;
S.N. Aleksakhina, E.N. Imyaninov, N.M. Mudzhiri: performing molecular testing;
A.G. Kudaybergenova: performing immunohistochemical examinations, collecting and analyzing the data;
E.A. Baychorov, A.A. Bozhok, V.A. Vasin, V.I. Vladimirov, O.A. Volynshchikova, A.Yu. Vorontsov, E.A. Gaysina, A.A. Gofman, V.V. Klimenko, A.V. Komyakhov, M.M. Konstantinova, M.V. Kopp, I.A. Lalak, D.L. Matevosyan, O.V. Poltareva, V.F. Semiglazov, T.Yu. Semiglazova, L.A. Churilova: collecting and analyzing the data.

ORCID авторов / ORCID of authors

R.M. Палтуев / R.M. Paltuev: <https://orcid.org/0000-0002-0871-9453>
С.Н. Алексахина / S.N. Aleksakhina: <https://orcid.org/0000-0002-2149-7728>
А.С. Артемьева / A.S. Artemyeva: <https://orcid.org/0000-0002-2948-397X>
Э.А. Байчоров / E.A. Baichorov: <https://orcid.org/0000-0002-6292-1775>
О.А. Волинщикова / O.A. Volynshchikova: <https://orcid.org/0009-0001-9454-1320>
Е.Н. Имянитов / E.N. Imyaninov: <https://orcid.org/0000-0003-4529-7891>
В.В. Клименко / V.V. Klimenko: <https://orcid.org/0000-0003-1079-4492>
А.В. Комяхов / A.V. Komyakhov: <https://orcid.org/0000-0002-6598-1669>
М.В. Копп / M.V. Kopp: <https://orcid.org/0000-0002-2783-9493>
А.Г. Кудайбергенова / A.G. Kudaybergenova: <https://orcid.org/0000-0001-7797-088X>
Н.М. Муджири / N.M. Mudzhiri: <https://orcid.org/0000-0002-3835-6622>
В.Ф. Семиглазов / V.F. Semiglazov: <https://orcid.org/0000-0003-0077-9619>
Т.Ю. Семиглазова / T.Yu. Semiglazova: <https://orcid.org/0000-0002-4305-6691>
М.М. Урезкова / M.M. Urezkova: <https://orcid.org/0000-0002-4242-2629>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. Novartis provided a grant for the study. Pfizer provided an independent grant for the study.

Финансирование. Компания «Новартис» предоставила грант на проведение исследования. Компания «Пфайзер» предоставила независимый грант на проведение исследования.

Funding. Novartis provided a grant for the study. Pfizer provided an independent grant for the study.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России. Все пациентки подписали информированное согласие на использование своих персональных данных.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. All patients signed an informed consent to the use of their personal data.