

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-4-16-25>



Возможности пункционной тонкоигольной аспирационной биопсии в изучении молекулярно-генетического «портрета» ткани молочной железы

В.В. Родионов, О.В. Бурменская, В.В. Кометова, А.А. Сметник, М.В. Родионова, Д.Ю. Трофимов, Л.А. Ашрафян, Г.Т. Сухих

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Академика Опарина, 4

Контакты: Валерий Витальевич Родионов dr.valery.rodionov@gmail.com

Введение. Стандартным методом получения материала для морфологического и молекулярно-генетического методов исследования в настоящее время является трепанобиопсия молочной железы. К сожалению, этот метод сопряжен с целым рядом проблем, прежде всего с вероятностью осложнений (кровотечением, пневмотораксом) и дискомфортом во время проведения манипуляции.

Цель исследования – анализ транскрипционных сигнатур биоптатов ткани молочной железы, полученных методом пункционной тонкоигольной аспирационной биопсии.

Материалы и методы. Методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции исследован уровень экспрессии мРНК 60 целевых генов в 60 биоптатах, полученных методом тонкоигольной пункционной аспирационной биопсии, и в 60 образцах соответствующих фиксированных в формалине и парафинизированных (FFPE) тканей молочной железы, полученных в результате оперативного вмешательства. Биоптаты молочной железы получали из опухоли, прилежащей ткани, так называемого опухолевого ложа и условно нормальной ткани на отдалении от первичного очага.

Результаты. Сравнительный анализ транскрипционных сигнатур биоптатов, полученных методом пункционной тонкоигольной аспирационной биопсии, и FFPE-тканей (всего 120 образцов) продемонстрировал, что наилучшие корреляционные связи транскрипционных сигнатур биоптатов и FFPE-тканей получены для образцов опухолей. Очень высокие корреляционные связи в образцах опухолей установлены для 1 гена (*CTSL2*), высокие – для 18 генов (*MKI67, MYBL2, NAT1, PTEN, TPX2, PTTG1, UBE2T, CCNB1, ESR1, CCND1, MYC, SCGB2A2, MIA, TRAC, FGFR4, ANLN, GSTM1, PRLR*), средние – для 28 генов (*PGR, AURCA, KRT5, FOXA1, SFRP1, EMSY, EXO1, PAK1, KIF14, ERBB2, MMP11, BCL2, BAG1, TMEM45B, BIRC5, CD274/PDL1, ZNF703, TYMS, CCNE1, TPT1, TMEM45A, BRCA1, BRCA2, ESR2, STS, TNFSF11/RANKL, TNFRSF11B/OPG, TNF*), слабые – для 4 генов (*GRB7, EGFR, PGRMC1, CYP19A*). Наличие корреляционных связей транскрипционных сигнатур биоптатов и FFPE-тканей прослеживается при наличии достаточного количества материала, соответствующего контролю взятия материала ≥ 5 lg для гена *B2M*.

Выводы. Возможность проведения молекулярно-генетического исследования на малом количестве материала пунктата ткани молочной железы делает возможным получение материала наиболее малоинвазивным методом. А это, в свою очередь, расширяет возможности для внедрения «генетического мониторинга» злокачественных новообразований, а также возможности более точной оценки рисков развития злокачественного новообразования на фоне доброкачественных процессов молочной железы у пациенток с фиброзно-кистозной болезнью и повышенной маммографической плотностью.

Ключевые слова: пункционная тонкоигольная аспирационная биопсия, жидкостная цитология, трепанобиопсия, рак молочной железы, фиброзно-кистозная болезнь, транскрипционные профили генов, полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Для цитирования: Родионов В.В., Бурменская О.В., Кометова В.В. и др. Возможности пункционной тонкоигольной аспирационной биопсии в изучении молекулярно-генетического «портрета» ткани молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2023;19(4):16–25. DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-4-16-25>

Fine-needle aspiration biopsy possibilities in studying the molecular genetic landscape of breast tissue

V.V. Rodionov, O.V. Burmenskaya, V.V. Kometova, A.A. Smetnik, M.V. Rodionova, D. Yu. Trofimov,
L.A. Ashrafyan, G.T. Sukhikh

V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia; 4 Akademika
Oparina St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Valeriy Vitalyevich Rodionov dr.valery.rodionov@gmail.com

Background. Core biopsy of the breast is currently considered to be the standard method of obtaining material for morphological and molecular genetic methods. Unfortunately, this method is associated with a number of problems, primarily the risk of complications (bleeding, pneumothorax) and discomfort during manipulation.

Aim. To analyze transcriptional signatures of breast tissue samples obtained by fine-needle aspiration biopsy.

Materials and methods. Using reverse transcriptase polymerase chain reaction, we studied the mRNA expression level of 60 target genes in 60 samples obtained by fine-needle aspiration biopsy and in 60 corresponding formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) surgical specimens of breast. Samples were obtained from the tumor, adjacent tissue, the so-called tumor bed and formally normal tissue at a distance from the primary lesion.

Results. A comparative analysis of transcriptional signatures in samples obtained by fine-needle aspiration biopsy and FFPE specimens (120 samples in total) revealed the strongest correlations between transcriptional signatures in biopsy samples and FFPE specimens of tumors. Very strong correlation in tumor samples was established for one gene (*CTSL2*); strong for 18 genes (*MKI67*, *MYBL2*, *NAT1*, *PTEN*, *TPX2*, *PTTG1*, *UBE2T*, *CCNB1*, *ESR1*, *CCND1*, *MYC*, *SCGB2A2*, *MIA*, *TRAC*, *FGFR4*, *ANLN*, *GSTM1*, *PRLR*); averages for 28 genes (*PGR*, *AURCA*, *KRT5*, *FOXA1*, *SFRP1*, *EMSY*, *EXO1*, *PAK1*, *KIF14*, *ERBB2*, *MMP11*, *BCL2*, *BAG1*, *TMEM45B*, *BIRC5*, *CD274/PDL1*, *ZNF703*, *TYMS*, *CCNE1*, *TPT1*, *TMEM45A*, *BRCA1*, *BRCA2*, *ESR2*, *STS*, *TNFSF11/RANKL*, *TNFRSF11B/OPG*, *TNF*); weak for 4 genes (*GRB7*, *EGFR*, *PGRMC1*, *CYP19A*). The presence of correlations between transcriptional signatures in biopsy samples and FFPE specimens can be established in case of sufficient material corresponding to sample intake control (SIC) ≥ 5 lg for *B2M* gene.

Conclusion. The ability to conduct molecular genetic research on small samples of breast tissue makes it possible to obtain the material using the most minimally invasive method. And this, in turn, expands the possibilities of "genetic monitoring" of cancer, as well as the possibility of more accurate assessment the risks of malignant tumor development in the settings of benign conditions in women with fibrocystic disease and increased mammographic density.

Keywords: fine-needle aspiration biopsy, liquid cytology, core biopsy, breast cancer, fibrocystic disease, gene transcription profiles, real-time polymerase chain reaction

For citation: Rodionov V.V., Burmenskaya O.V., Kometova V.V. et al. Fine-needle aspiration biopsy possibilities in studying the molecular genetic landscape of breast tissue. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy* = Tumors of female reproductive system 2023;19(4):16–25. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-4-16-25>

Введение

«Золотым стандартом» морфологической диагностики новообразований молочной железы по-прежнему является гистологическое исследование. Поэтому, несмотря на высокую точность цитологического метода в верификации злокачественных новообразований (ЗНО) после внедрения в практику трепанобиопсии молочной железы, широко обсуждался вопрос о роли пункционной тонкоигольной аспирационной биопсии (ПТАБ) в диагностике различных процессов в молочной железе [1, 2]. Широкое распространение доброкачественных процессов молочной железы, высокие показатели чувствительности и специфичности цитологического метода в определении злокачественности процессов, меньшая частота редких, но все же встречающихся при трепанобиопсии осложнений (таких как гематома и пневмоторакс), меньшая стоимость и короткий период ожидания ответа, а также меньший страх женщин перед ПТАБ, чем перед трепанобио-

псией, привели к тому, что цитологический метод, входя в состав «тройного диагностического теста» наравне с физикальным методом и методами лучевой визуализации, по-прежнему является ведущим методом морфологической оценки большинства патологических процессов молочной железы [3–6].

Эффективность цитологического метода во многом зависит от правильной организации преаналитического этапа работы: полноценности пунктата с достаточным количеством клеточного материала, своевременной фиксации, условий хранения и транспортировки, окраски, качества приготовления цитологических мазков, а также от квалификации цитолога, оценивающего адекватно приготовленные препараты [7]. Стремление улучшить качество цитологической диагностики и уменьшить недостатки традиционного исследования привело к разработке новой технологии — метода жидкостной цитологии. Использование жидкостных технологий приготовления препаратов

дает дополнительные возможности для транспортировки, длительного хранения и архивирования материала, стандартизации приготовления и окраски и применения дополнительных методик, таких как иммуноцитохимическое исследование и молекулярно-генетическое тестирование.

Целью настоящего исследования явился анализ транскрипционных сигнатур биоптатов ткани молочной железы, полученных методом ПТАБ.

Материалы и методы

В целях моделирования биопсии тканей молочной железы методом ПТАБ выполнен забор материала из операционного материала у 20 пациенток, получавших лечение в отделении патологии молочной железы ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России в период с февраля по август 2022 г. по поводу рака молочной железы (РМЖ). Возраст женщин варьировал от 32 до 86 лет и в среднем составил 59 лет. Биоптаты молочной железы получали из опухоли, прилежащей ткани, так называемого опухолевого ложа и условно нормальной ткани на отдалении от первичного очага.

Полученный материал биоптатов переносили в вials с транспортной средой для жидкостной цитологии CellPrep (Biodyne, Корея). В качестве контрольных образцов использовали фиксированные в формалине и запечатанные в парафин (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) ткани, соответствующие биоптатам. Таким образом, от каждой пациентки исследовано по 6 образцов, всего 120 образцов тканей молочной железы.

Для выделения РНК из биоптатов клетки осаждали путем центрифугирования на скорости 13 000 об/мин, далее использовали коммерческие наборы «Проба-НК», перед выделением РНК из FFPE-тканей проводили предварительную обработку образцов протеиназой К с помощью набора «Проба-ПК» (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия). Полученные препараты РНК сразу использовали для постановки реакции обратной транскрипции со смесью специфичных для каждого гена олигонуклеотидов. Реакцию проводили в объеме реакционной смеси 40 мкл при температуре 40 °C в течение 30 мин, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95 °C в течение 5 мин. Для увеличения объемов образцов после обратной транскрипции комплементарную ДНК разводили в 10 раз в ТЕ-буфере.

Методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции был исследован уровень экспрессии мРНК 60 целевых генов: *ESR1*, *ESR2*, *PGR*, *PGRMC1*, *AR*, *PRLR* (группа рецепторов и корецепторов гормонов), *STS*, *CYP19A* (гены гормонов), *ERBB2*, *GRB7*, *FGFR4*, *EGFR* (группа рецепторов ростовых факторов), *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA/STK15*, *BIRC5*, *CCND1*,

CCNE1, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TMEM45A*, *TPX2*, *ANLN*, *TPT1* (группа генов, регулирующих пролиферацию, клеточный цикл, митоз, формирование веретена деления), *CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *MMP11* (группа генов, регулирующих миграцию клеток, инвазию, организацию цитоскелета), *PTEN*, *SFRP1* (гены, ассоциированные с супрессией опухолей), *BCL2*, *BAG1* (гены апоптоза), *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *MYC* (факторы транскрипции), *TYMS*, *EXO1*, *BRCA1*, *BRCA2* (группа генов, регулирующих репликацию и репарацию ДНК), *SCGB2A2*, *KRT5*, *MIA* (маркеры дифференцировки клеток и коэкспрессированные с ними гены), *CD274/PD-L1*, *TRAC*, *CD68*, *TNFRSF11A/RANK*, *TNFRSF11/RANKL*, *TNFRSF11B/OPG*, *TNF*, *VEGFA*, *IL1B*, *MMP9* (гены иммунной системы, воспаление), *GSTM1* (ген детоксикации ксенобиотиков), *NAT1* (ген ариламин-N-ацетилтрансферазы), *UBE2T* (ген убиквитинирования белков), а также 2 референсных гена: *B2M* и *GUSB*.

Транскрипционный профиль генов определяли методом мультиплексной обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием праймеров и флуоресцентно-меченных проб (Fam, Cy5), специфичных к последовательностям определяемых РНК (реактивы и детектирующие амплификаторы «ДТпрайм» производства ООО «НПФ ДНК-Технология» (Россия)).

Амплификацию осуществляли в объеме 12 мкл по следующей программе: 1 цикл – 80 °C 30 с, 94 °C 5 мин; 5 циклов – 94 °C 30 с, 64 °C 15 с; 45 циклов – 94 °C 10 с, 64 °C 20 с; 10 °C – хранение. «Горячий старт» обеспечивался использованием Taq-полимеразы, активность которой блокировалась антителами и восстанавливалась при прогреве 94 °C. Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64 °C.

Оценку уровня экспрессии мРНК осуществляли методом ΔC_p с расчетом на нормировочный фактор (среднее значение (C_p) референсных генов *B2M* и *GUSB*). Уровень экспрессии мРНК оценивали в логарифмической $\ln$ -шкале в относительных единицах. По экспрессии гена *B2M* определяли контроль взятия материала (КВМ).

Для сравнения уровня экспрессии в FFPE-тканях и биоптатах рассчитывали коэффициент корреляции. Корреляционные связи устанавливали с использованием метода ранговой корреляции по Спирмену. Силу предполагаемой взаимосвязи между величинами определяли по значению коэффициента корреляции и уровню достоверности корреляции ($p < 0,05$). При оценке силы связи коэффициентов корреляции использовали шкалу Чеддока и учитывали слабые (от 0,3 до 0,5), средние (от 0,5 до 0,7), высокие (от 0,7 до 0,9) и очень высокие ($> 0,9$) положительные корреляционные связи. При отрицательной корреляции значения

силы связи между переменными соответственно меняли на противоположные.

Классификацию подтипов материала осуществляли согласно методу, изложенному нами ранее для диагностики молекулярных подтипов РМЖ [8].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ Statistica 10 и SPSS 17.

Результаты

При гистологическом исследовании во всех 20 образцах подтверждено наличие ЗНО, в 18 из 20 случаев – инвазивный РМЖ. Размеры опухоли <2 см были зарегистрированы в 10 (55,6 %) из 18 случаев инвазивного РМЖ, в остальных случаях размеры опухоли составляли от 2 до 5 см. Метастазы в регионарные лимфатические узлы диагностированы у 1/4 пациенток. Образцы с низкой степенью злокачественности (grade 1) не регистрировалось, умеренная степень злокачественности (grade 2) была отмечена у 15 (75 %) больных РМЖ, высокая (grade 3) – у 5 (25 %). Во всех образцах условно нормальной ткани отсутствовали клетки с атипией, однако в 12 образцах отмечены такие патологии, как эктазия протоков ($n = 5$), фокусы склерозирующего аденоза ($n = 1$), фибросклероз и фиброзирование стромы ($n = 5$), типичная протоковая пролиферация ($n = 1$). В 3 образцах опухолевого ложа присутствовали клетки с атипией, в 6 – комплексы рака *in situ* (в 3 образцах – протоковая карцинома *in situ*, в 3 – лобулярная карцинома *in situ*), помимо этого в некоторых образцах отмечены такие патологии, как типичная протоковая пролиферация ($n = 1$), лимфоидная инфильтрация стромы ($n = 3$), комплексы склерозирующего аденоза ($n = 2$), фибросклероз ($n = 3$) и эктазия протоков ($n = 3$).

Анализ цитогрaмм биопсийного материала продемонстрировал, что во всех случаях при ПТАБ опухолевого очага подтвержден злокачественный характер опухоли. При цитологическом исследовании опухолевого ложа и условно нормальной ткани клетки протокового эпителия были диагностированы в 5 случаях в каждой группе, клетки пролиферирующего эпителия без атипии – в 1 случае в каждой группе, атипические клетки – в 4 и 1 случаях соответственно. Во всех остальных случаях выявлялись жир, бесструктурные аморфные массы, фиброзная ткань, детрит. В 1 случае клеточные элементы не были получены.

Экспрессия нормировочных референсных генов *B2M* и *GUSB* отмечена во всех 60 FFPE-образцах ткани и в 59 из 60 образцов биоптатов, полученных методом ПТАБ. KBM оценивали по уровню экспрессии гена *B2M* и рассчитывали в условных lg-единицах по формуле:

$$KBM = (45 - Cp)/3,4,$$

где 45 – максимальный пороговый цикл, Cp – экспериментально полученный пороговый цикл *B2M*, 3,4 – разница пороговых циклов при 10-кратном разведении образца, также известная как “slope”.

Распределение значений KBM в группах образцов представлено в табл. 1. Предполагалось, что количество материала будет достаточным при значении KBM не менее 4–5 lg.

Учет количества образцов без экспрессии гена может быть одним из факторов оценки валидности результатов и определения эффективности забора материала при биопсии. Однако необходимо учитывать, что отсутствие экспрессии гена в эксперименте может быть следствием его низкой экспрессии *in vivo* вследствие специфики ткани. Например, при биопсии нормальной ткани молочной железы предполагается наличие жировой ткани с низкой клеточностью материала, пролиферативная активность которой может быть низкой. В тканях опухоли или опухолевого ложа, в котором также вероятно наличие патологического процесса, возможна потеря экспрессии гена (например, потеря экспрессии прогестероновых рецепторов в HER2-обогащенных, трижды негативных опухолях, а также в некоторых люминальных В-подобных опухолях). Поэтому важна была оценка потери экспрессии гена в биоптатах по сравнению с FFPE-контролем. Наше исследование продемонстрировало удовлетворительные результаты в плане выявления экспрессии генов для FFPE-тканей и образцов пункционных биоптатов опухолей. Вместе с тем в образцах биоптатов условно нормальных тканей и опухолевого ложа, полученных методом ПТАБ, отмечено выпадение экспрессии значительной части генов в 1/2 и 1/3 случаев соответственно.

Наличие положительных корреляционных связей между экспрессией гена в образцах FFPE-тканей и пункционных биоптатах может свидетельствовать об эффективности забора материала при биопсии. Корреляционные связи устанавливали для каждого гена отдельно с использованием метода ранговой корреляции по Спирмену, что позволило провести отбор генов для работы с биоптатами. При оценке силы связи коэффициентов корреляции использовали шкалу Чеддока и учитывали слабые (от 0,3 до 0,5), средние (от 0,5 до 0,7), высокие (от 0,7 до 0,9) и очень высокие (>0,9) положительные корреляционные связи.

Статистически значимые корреляционные связи не установлены при общем анализе всех образцов без разделения на группы и количество материала.

Положительные корреляционные связи получены для образцов опухолей (табл. 2). Очень высокие корреляционные связи в образцах опухолей установлены для гена *CTSL2*; высокие – для генов *MKI67*, *MYBL2*, *NAT1*, *PTEN*, *TPX2*, *PTTG1*, *UBE2T*, *CCNB1*, *ESR1*, *CCND1*, *MYC*, *SCGB2A2*, *MIA*, *TRAC*, *FGFR4*, *ANLN*,

Таблица 1. Контроль взятия материала для гена B2M в группах образцов
Table 1. Sample intake control (SIC) for gene B2M in groups of samples

Группа образцов Groups of samples	0–3 lg	3–4 lg	4–5 lg	>5 lg
FFPE-ткань—условная норма FFPE-tissue—conditional norm <i>n</i> = 20	0	0	2/20 (10 %)	18/20 (90 %)
FFPE-ткань—опухоль FFPE-tissue—tumor <i>n</i> = 20	0	0	0	20/20 (100 %)
FFPE-ткань—опухолевое ложе FFPE-tissue—tumor bed <i>n</i> = 20	0	0	0	20/20 (100 %)
Пункционный биоптат—условная норма FNA biopsy—conditional norm <i>n</i> = 20	0	5/20 (25 %)	7/20 (35 %)	8/20 (40 %)
Пункционный биоптат—опухоль FNA biopsy—tumor <i>n</i> = 20	0	0	1/20 (5 %)	19/20 (95 %)
Пункционный биоптат—опухолевое ложе FNA biopsy—tumor bed <i>n</i> = 20	1/20 (5 %)	2/20 (10 %)	7/20 (35 %)	10/20 (50 %)

Примечание. FFPE — фиксированная в формалине и запечатанная в парафин; FNA — тонкоигольная аспирационная биопсия.
Note. FFPE — formalin-fixed paraffin-embedded; FNA — fine needle aspiration biopsy.

Таблица 2. Корреляционные связи уровней экспрессии генов в образцах пункционных биоптатов и FFPE-тканей
Table 2. Correlations of gene expression levels in FNA biopsy samples and FFPE tissues

Ген Gene	Значение коэффициента корреляции для образцов опухолей Correlation coefficient value for tumor samples	Уровень значимости Significance level	Значение коэффициента корреляции для образцов с KBM ≥ 5 lg Correlation coefficient value for samples with SIC ≥ 5 lg	Уровень значимости Significance level
MKI67	0,747	$1,5 \times 10^{-4}$	0,398	0,005
GRB7	0,482	0,031	0,529	$1,1 \times 10^{-4}$
PGR	0,648	0,002	0,154	0,297
CTSL2	0,903	$4,9 \times 10^{-8}$	0,485	$4,8 \times 10^{-4}$
MYBL2	0,891	$1,4 \times 10^{-7}$	0,745	$1,2 \times 10^{-9}$
AURKA	0,649	0,002	0,355	0,013
CDKN2A	0,321	0,167	0,294	0,043
KRT5	0,619	0,004	0,336	0,024
FOXA1	0,695	0,001	0,585	$1,3 \times 10^{-5}$
SFRP1	0,527	0,017	0,145	0,325
NAT1	0,802	$2,1 \times 10^{-5}$	0,400	0,005
PTEN	0,742	$1,8 \times 10^{-4}$	0,469	0,001
CD68	−0,208	0,379	0,012	0,936
EMSY	0,585	0,007	0,303	0,037

Продолжение табл. 2
Continuation of the table 2

Ген Gene	Значение коэффициента корреляции для образцов опухолей Correlation coefficient value for tumor samples	Уровень значимости Significance level	Значение коэффициента корреляции для образцов с КВМ ≥ 5 lg Correlation coefficient value for samples with SIC ≥ 5 lg	Уровень значимости Significance level
GATA3	0,436	0,055	0,473	0,001
EXO1	0,639	0,002	0,468	0,001
PPP2R2A	0,200	0,399	-0,123	0,407
TPX2	0,805	$1,9 \times 10^{-5}$	0,435	0,003
PAK1	0,682	0,001	0,231	0,114
PTTG1	0,788	$3,6 \times 10^{-5}$	0,460	0,001
UBE2T	0,856	$1,5 \times 10^{-6}$	0,431	0,002
KIF14	0,538	0,014	-0,059	0,692
CCNB1	0,706	0,001	0,371	0,009
ERBB2	0,628	0,003	0,565	$2,9 \times 10^{-5}$
ESR1	0,863	$1,0 \times 10^{-6}$	0,594	$8,5 \times 10^{-6}$
MMP11	0,621	0,003	0,521	$1,4 \times 10^{-4}$
CCND1	0,814	$1,2 \times 10^{-5}$	0,540	$7,4 \times 10^{-5}$
BCL2	0,693	0,001	0,277	0,065
BAG1	0,510	0,022	0,280	0,054
EGFR	0,449	0,047	0,092	0,534
TMEM45B	0,619	0,004	0,464	0,001
MYC	0,749	$1,4 \times 10^{-4}$	0,087	0,558
SCGB2A2	0,816	$1,2 \times 10^{-5}$	0,380	0,008
MIA	0,722	$3,2 \times 10^{-4}$	0,340	0,018
BIRC5	0,674	0,001	0,475	0,001
CD274	0,526	0,017	-0,039	0,792
TRAC	0,727	$2,9 \times 10^{-4}$	0,489	$4,3 \times 10^{-4}$
AR	0,442	0,051	0,173	0,256
ZNF703	0,556	0,011	0,196	0,181
TYMS	0,656	0,002	0,360	0,012
CCNE1	0,570	0,009	0,324	0,025
TPT1	0,595	0,006	0,118	0,424
FGFR4	0,760	$1,0 \times 10^{-4}$	0,216	0,141
ANLN	0,840	$3,5 \times 10^{-6}$	0,299	0,039
TMEM45A	0,640	0,002	0,325	0,024
MMP9	0,395	0,084	0,130	0,380

Окончание табл. 2
End of the table 2

Ген Gene	Значение коэффициента корреляции для образцов опухолей Correlation coefficient value for tumor samples	Уровень значимости Significance level	Значение коэффициента корреляции для образцов с KBM ≥ 5 lg Correlation coefficient value for samples with SIC ≥ 5 lg	Уровень значимости Significance level
BRCA1	0,577	0,008	0,389	0,008
BRCA2	0,637	0,003	-0,241	0,099
ESR2	0,683	0,001	0,372	0,009
PGRMC1	0,477	0,034	0,384	0,007
CYP19A	0,469	0,037	0,268	0,065
STS	0,618	0,004	0,490	$4,1 \times 10^{-4}$
TNFRSF11A/RANK	0,066	0,783	0,050	0,737
TNFSF11/RANKL	0,636	0,003	0,610	$4,1 \times 10^{-6}$
TNFRSF11B/OPG	0,518	0,019	0,177	0,230
GSTM1	0,849	0,001	0,564	0,003
PRLR	0,734	$2,3 \times 10^{-4}$	0,550	$5,2 \times 10^{-5}$
TNF	0,543	0,013	0,245	0,094
VEGFA	0,336	0,147	0,282	0,091
IL1B	0,358	0,121	0,273	0,102

Примечание. FFPE – фиксированная в формалине и запечатанная в парафин; FNA – тонкоигольная аспирационная биопсия; KBM – контроль взятия материала.

Note. FFPE – formalin-fixed paraffin-embedded; FNA – fine needle aspiration biopsy; SIC – sample intake control.

GSTM1, PRLR; средние – для генов PGR, AURKA, KRT5, FOXA1, SFRP1, EMSY, EXO1, PAK1, KIF14, ERBB2, MMP11, BCL2, BAG1, TMEM45B, BIRC5, CD274/PDL1, ZNF703, TYMS, CCNE1, TPT1, TMEM45A, BRCA1, BRCA2, ESR2, STS, TNFSF11/RANKL, TNFRSF11B/OPG, TNF; слабые – для генов GRB7, EGFR, PGRMC1, CYP19A.

Обращает на себя внимания тот факт, что статистически значимые корреляционные связи были получены при общем анализе всех образцов при введении ограничения по количеству KBM $B2M \geq 5$ lg.

С учетом валидности полученных результатов для образцов опухолей определен молекулярно-генетический подтип в FFPE-образцах и биоптатах опухолей, полученных методом ПТАБ. Несовпадение по молекулярно-генетическому подтипу в FFPE-образцах и аспиратах опухоли зарегистрировано в 3 случаях: переход из люминального А в люминальный В HER2-отрицательный подтип зарегистрирован в 2 случаях, переход из люминального А в трижды негативный подтип – в 1 случае. Таким образом, можно констатировать, что в 75 % случаях молекулярно-генетический подтип опухоли, определяемый методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции из материала,

полученного методом ПТАБ, совпадает с таковым при использовании FFPE-образцов.

Обсуждение

Рак молочной железы является наиболее актуальной проблемой современной онкологии, что в первую очередь обусловлено высокой заболеваемостью. Согласно данным GLOBOCAN – совместного проекта Всемирной организации здравоохранения и Международного агентства исследований рака (IARC), в 2020 г. в мире было зарегистрировано >2 261 419 новых случаев РМЖ, что составляет 11,7 % от числа всех случаев ЗНО [9]. В Российской Федерации в 2021 г. было выявлено 69 714 новых случаев РМЖ [10]. При этом именно РМЖ в нашей стране занимает 1-е место в структуре общей онкологической заболеваемости, составляя 12,1 %. В структуре женской онкологической заболеваемости данная опухоль на протяжении уже многих лет лидирует, достигая 22,1 %, причем прирост заболеваемости за последние 10 лет составил 18,98 %.

Неуклонный рост заболеваемости РМЖ как в мире в целом, так и в нашей стране, с одной стороны, говорит о том, что этиологических факторов РМЖ

достаточно много, и они недостаточно изучены, с другой — о том, что плохо разработаны методы эффективной профилактики, позволяющие защитить женщин от возникновения данной опухоли. Все это диктует необходимость сконцентрировать максимум внимания на заболеваниях, которые с высокой степенью достоверности увеличивают риск развития РМЖ. И речь идет прежде всего о наиболее распространенном доброкачественном заболевании молочной железы — фиброзно-кистозной болезни (ФКБ). Статистический учет ФКБ не ведется, но, по оценкам ряда авторов, ее частота в женской популяции составляет 50 %, что позволяет обоснованно считать, что именно эта группа заболеваний является самой распространенной патологией молочных желез [11, 12]. В настоящее время взгляды на ФКБ претерпели существенные изменения, и в целом данная патология не считается предраком или стадией онкологического процесса в молочной железе. Однако не следует недооценивать роль ФКБ в развитии РМЖ. Риск развития РМЖ на фоне ФКБ во многом зависит от выраженности пролиферативных процессов, протекающих в ткани молочной железы. Коллегия американских патологов рекомендовала подразделять женщин с ФКБ на 3 категории в зависимости от выявленных при биопсии морфологических изменений, определяющих риск развития РМЖ [11, 13–15]:

- 1) непролиферативная ФКБ: риск развития РМЖ не повышен и соответствует таковому в популяции;
- 2) пролиферативная ФКБ без атипии: риск развития РМЖ повышен в 1,5–2,0 раза по сравнению с популяцией;
- 3) пролиферативная ФКБ с атипией: риск развития РМЖ повышен в 4–5 раз по сравнению с популяцией.

Именно атипичная гиперплазия несет реальную угрозу развития ЗНО молочной железы. Природа атипичных гиперплазий до конца не понятна. Поэтому в последнее время все большее внимание уделяется молекулярно-генетическим методам для уточнения фенотипических особенностей данной группы заболеваний. Как показали результаты наших более ранних исследований, ФКБ с атипичной пролиферацией характеризуется статистически значимым повышением экспрессии мРНК генов *MKI67*, *CCNB1*, *KIF14*, *PTTG1*, *ANLN*, *TMEM45B*, *TPX2*, *PRLR*, *FGFR4*, *MMP11*, *GATA3*, *EXO1*, *TYMS*, *NAT1* и снижением экспрессии мРНК генов *MYC*, *RANK*, *TNFA*, *MMP9* [16].

Стандартным методом получения материала для морфологического и молекулярно-генетического методов исследования в настоящее время является трепанобиопсия молочной железы. К сожалению, этот метод сопряжен с целым рядом проблем, прежде всего с вероятностью осложнений (кровотечением, пневмотораксом) и дискомфортом во время проведения

манипуляции. В связи с этим уговорить пациентку на проведение трепанобиопсии, особенно в тех случаях, когда речь не идет о подозрении на ЗНО, крайне сложно. Поэтому попытка применить для указанных целей менее инвазивную ПТАБ представляется крайне важной.

В рамках выполнения диссертационной работы, посвященной современной стратегии профилактики РМЖ, А.А. Мещеряковым была разработана оригинальная методика периареолярной тонкоигольной пункции, которая позволила проводить цитологическую диагностику предраковых состояний эпителия молочных желез у здоровых женщин [17]. С одной стороны, автор обращает внимание на то, что предложенная методика ПТАБ обеспечивает высокую клеточность материала, позволяя эффективно осуществлять цитологическое и иммуноцитохимическое исследования. С другой стороны, он делает вывод о том, что клеточность материала увеличивается при прогрессировании предраковых изменений в молочной железе от непролиферативной формы ФКБ до атипичной гиперплазии.

В нашем исследовании метод жидкостной цитологии был применен не только для оценки пролиферативных процессов в тканях молочной железы, но и для молекулярно-генетического анализа. Полученные данные, как и в работе А.А. Мещерякова, показали, что результаты, в том числе молекулярно-генетического исследования, прежде всего зависят от клеточности материала.

Наше исследование имеет ограничение в том плане, что средний возраст пациенток составил 59 лет. Именно в этой возрастной группе чаще всего происходит жировая инволюция ткани молочной железы и получить материал с высокой клеточностью методом ПТАБ крайне сложно. Вместе с тем внушает определенный оптимизм тот факт, что ФКБ — удел женщин репродуктивного возраста с пиком заболеваемости в интервале 40–45 лет, у которых молочная железа преимущественно представлена железистой тканью и можно рассчитывать на получение материала с высокой клеточностью [18]. Кроме того, известным и наиболее значимым фактором риска развития РМЖ является маммографическая плотность, которая характеризует тканевое строение молочной железы при рентгеновской визуализации: соотношение эпителиального и стромального (фиброзного) компонентов, с одной стороны, и жира — с другой. Проведено несколько метаанализов и эпидемиологических исследований, в которых доказано, что увеличение маммографической плотности независимо от других факторов риска достоверно повышает риск развития РМЖ [19–21]. Таким образом, пациентки с повышенной маммографической плотностью — еще одна целевая аудитория для выполнения ПТАБ и определения

цитологических и молекулярно-генетических предикторов РМЖ.

Выводы

Сравнительный анализ транскрипционных сигнатур биоптатов, полученных методом ПТАБ, и FFPE-тканей (всего 120 образцов) продемонстрировал, что наилучшие корреляционные связи транскрипционных сигнатур биоптатов и FFPE-тканей получены для образцов опухолей. Очень высокие корреляционные связи в образцах опухолей установлены для 1 гена (*CTSL2*); высокие — для 18 генов (*MKI67*, *MYBL2*, *NAT1*, *PTEN*, *TPX2*, *PTTG1*, *UBE2T*, *CCNB1*, *ESR1*, *CCND1*, *MYC*, *SCGB2A2*, *MIA*, *TRAC*, *FGFR4*, *ANLN*, *GSTM1*, *PRLR*); средние — для 28 генов (*PGR*, *AURCA*, *KRT5*, *FOXA1*, *SFRP1*, *EMSY*, *EXO1*, *PAK1*, *KIF14*, *ERBB2*, *MMP11*, *BCL2*, *BAG1*, *TMEM45B*, *BIRC5*, *CD274/PDL1*, *ZNF703*, *TYMS*, *CCNE1*, *TPT1*, *TMEM45A*,

BRCA1, *BRCA2*, *ESR2*, *STS*, *TNFSF11/RANKL*, *TNFRSF11B/OPG*, *TNFA*); слабые — для 4 генов (*GRB7*, *EGFR*, *PGRMC1*, *CYP19A*). Корреляционные связи транскрипционных сигнатур биоптатов и FFPE-тканей прослеживаются при наличии достаточного количества материала, соответствующего KBM ≥ 5 lg для гена *B2M*.

Возможность проведения молекулярно-генетического исследования на малом количестве материала пунктата ткани молочной железы делает возможным получение материала наиболее малоинвазивным методом. А это, в свою очередь, расширяет возможности для внедрения «генетического мониторинга» ЗНО, а также возможности более точной оценки рисков развития злокачественного новообразования на фоне доброкачественных процессов молочной железы у пациенток с фиброзно-кистозной болезнью и повышенной маммографической плотностью.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Nassar A. Core needle biopsy versus fine needle aspiration biopsy in breast — a historical perspective and opportunities in the modern era. *Diagn Cytopathol* 2011;39(5):380–8. DOI: 10.1002/dc.21433
2. Yu Y.H., Wei W., Liu J.L. Diagnostic value of fine-needle aspiration biopsy for breast mass: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2012;12:41. DOI: 10.1186/1471-2407-12-41
3. Farras Roca J.A., Tardivon A., Thibault F. et al. Diagnostic performance of ultrasound-guided fine-needle aspiration of nonpalpable breast lesions in a multidisciplinary setting: The Institut Curie's experience. *Am J Clin Pathol* 2017;147(6):571–9. DOI: 10.1093/ajcp/axq009
4. Hoda R.S., Brachtel E.F. International Academy of Cytology Yokohama System for Reporting Breast Fine-Needle Aspiration Biopsy Cytopathology: A review of predictive values and risks of malignancy. *Acta Cytol* 2019;63(4):292–301. DOI: 10.1159/000500704
5. Howell L.P., Gandour-Edwards R., Folkins K. et al. Adequacy evaluation of fine-needle aspiration biopsy in the breast health clinic setting. *Cancer* 2004;102(5):295–301. DOI: 10.1002/cncr.20497
6. Ljung B.M., Drejet A., Chiampi N. et al. Diagnostic accuracy of fine-needle aspiration biopsy is determined by physician training in sampling technique. *Cancer* 2001;93(4):263–8. DOI: 10.1002/cncr.9040
7. Волченко Н.Н., Славнова Е.Н., Тугулукова А.А. Жидкостная цитология в онкологии. *Онкология. Журнал им. П.А. Герцена*. 2013;2(5):26–31. Volchenko N.N., Slavnova E.N., Tugulukova A.A. Liquid cytology in oncology. *Onkologiya. Zhurnal im. P.A. Gertsena = Oncology. Journal named after P.A. Herzen* 2013;2(5):26–31. (In Russ.)
8. Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю., Кометова В.В. и др. Разработка и опыт использования транскрипционной сигнатуры генов в диагностике молекулярных подтипов рака молочной железы. *Акушерство и гинекология* 2020;(2):132–40. DOI: 10.18565/aig.2020.2.132-140 Burmenskaya O.V., Trofimov D.Yu., Kometova V.V. et al. Development and experience of using a transcriptional gene signature in the diagnosis of molecular subtypes of breast cancer. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and gynecology* 2020;(2):132–40. (In Russ.). DOI: 10.18565/aig.2020.2.132-140
9. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209–49.
10. Злокачественные заболевания в России в 2021 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 252 с. Malignant diseases in Russia in 2021 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, A.O. Shakhzadova. Moscow: P. Herzen Moscow Oncology Research Institute — branch of the National Medical Research Radiology Center, Ministry of Health of Russia, 2022. 252 p. (In Russ.)
11. Dyrstad S.W., Yan Y., Fowler A.M., Colditz G.A. Breast cancer risk associated with benign breast disease: Systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2015;149:569–75. DOI: 10.1007/s10549-014-3254-6.3
12. Onstad M., Stuckey A. Benign breast disorders. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2013;40(3):459–73. DOI: 10.1016/j.ogc.2013.05.004
13. Dupont W.D., Page D.L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. *N Engl J Med* 1985;312:146–51. DOI: 10.1056/NEJM198501173120303
14. Hartmann L.C., Sellers T.A., Frost M.H. et al. Benign breast disease and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:229–37. DOI: 10.1056/NEJMoa044383
15. Salamat F., Niakan B., Keshtkar A. et al. Subtypes of benign breast disease as a risk factor of breast cancer: A systematic review and meta-analyses. *Iran J Med Sci* 2018;43(4):355–64.
16. Бурменская О.В., Кометова В.В., Сметник А.А. и др. Особенности профилей транскрипции генов при фиброзно-кистозной болезни молочной железы. *Акушерство и гинекология* 2023;(7):55–65. DOI: 10.18565/aig.2023.77 Burmenskaya O.V., Kometova V.V., Smetnik A.A. et al. Features of gene transcription profiles in fibrocystic breast disease. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and gynecology* 2023;7: 55–65. (In Russ.). DOI: 10.18565/aig.2023.77
17. Мещеряков А.А. Современная стратегия профилактики рака молочной железы. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2017. 48 с. Meshcheryakov A.A. Modern strategy for the prevention of breast cancer. Abstract dis. ... cand. med. sciences. Moscow, 2017. 48 p. (In Russ.)

18. Fleming N.T., Armstrong B.K., Sheiner H.J. The comparative epidemiology of benign breast lumps and breast cancer in Western Australia. *Int J Cancer* 1982;30:147–52.
19. Bertrand K.A., Tamimi R.M., Scott C.G. et al. Mammographic density and risk of breast cancer by age and tumor characteristics. *Breast Cancer Res* 2013;15(6):R104. DOI: 10.1186/bcr3570
20. Bae J.M., Kim E.H. Breast density and risk of breast cancer in Asian women: A meta-analysis of observational studies. *J Prev Med Public Health* 2016;49(6):367–75. DOI: 10.3961/jpmph.16.054
21. Santen R.J., Mansel R. Benign breast disorders. *N Engl J Med* 2005;353(3):275–85. DOI: 10.1056/NEJMra035692

Вклад авторов

В.В. Родионов: концепция и дизайн исследования, написание статьи;
О.В. Бурменская: подбор и обработка материала, организация и проведение ПЦР-исследования, статистическая обработка данных, написание статьи;
В.В. Кометова: подбор и обработка материала;
А.А. Сметник, М.В. Родионова: редактирование статьи;
Д.Ю. Трофимов: организация и проведение ПЦР-исследования;
Л.А. Ашрафян, Г.Т. Сухих: концепция и дизайн исследования.

Authors' contributions

V.V. Rodionov: concept and design of the study, writing the article;
O.V. Burmenskaya: selection and processing of material, organization and conducting of PCR studies, statistical data processing, writing the article;
V.V. Kometova: selection and processing of material;
A.A. Smetnik, M.V. Rodionova: editing writing the article;
D.Yu. Trofimov: organization and conducting of PCR studies;
L.A. Ashrafyan, G.T. Sukhikh: concept and design of the study.

ORCID авторов / ORCID of authors

В.В. Родионов / V.V. Rodionov: <https://doi.org/0000-0003-0096-7126>
О.В. Бурменская / O.V. Burmenskaya: <https://doi.org/0000-0003-2842-3980>
В.В. Кометова / V.V. Kometova: <https://doi.org/0000-0001-9666-6875>
А.А. Сметник / A.A. Smetnik: <https://doi.org/0000-0002-0627-3902>
М.В. Родионова / M.V. Rodionova: <https://doi.org/0000-0002-0658-1454>
Д.Ю. Трофимов / D.Yu. Trofimov: <https://doi.org/0000-0002-1569-8486>
Л.А. Ашрафян / L.A. Ashrafyan: <https://doi.org/0000-0001-6396-4948>
Г.Т. Сухих / G.T. Sukhikh: <https://doi.org/0000-0002-7712-1260>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке научных исследований в рамках государственного задания «Оценка индивидуального риска рака молочной железы у женщин с доброкачественными заболеваниями (фиброзно-кистозной болезнью молочных желез» (номер государственного учета НОКТР 121040600432-9).

Funding. The work was performed with partial financial support for scientific research within the framework of the state task “Assessing the individual risk of breast cancer in women with benign diseases (fibrocystic disease) of the mammary glands” (state registration number NIOKTR 121040600432-9).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России (протокол № 5 от 27.05.2021). Все пациентки подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the bio-medical ethics committee of the V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Ministry of Health of Russia (protocol No. 5 of May 27, 2021). All patients signed informed consent to participate in the study.