

DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-4-26-35>



Изменение экспрессии мРНК драйверных генов онкогенеза при атипичной протоковой гиперплазии молочной железы

О.В. Бурменская, В.В. Кометова, А.А. Сметник, В.В. Родионов, 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: Ольга Владимировна Бурменская bourmenska@mail.ru

Введение. Атипичная протоковая гиперплазия является относительно распространенным поражением молочной железы, которое в 3,5–5,0 раза увеличивает риск развития рака молочной железы. В основе развития атипичных пролиферативных процессов и рака молочной железы лежат изменения в структуре генома, следствием которых становится изменение экспрессии генов.

Цель исследования – определение профиля экспрессии мРНК драйверных генов неоплазии и онкогенеза при атипичной протоковой гиперплазии молочной железы.

Материалы и методы. Методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции выполнено исследование экспрессионного профиля 46 генов в 107 образцах фиксированных в формалине и парафинизированных (FFPE) тканей молочной железы с атипичной протоковой гиперплазией, протоковой гиперплазией без атипии, протоковой карциномой *in situ* и нормальной ткани.

Результаты. При атипичной протоковой гиперплазии установлено изменение экспрессии 22 из 46 исследованных генов, включая статистически значимое повышение экспрессии *ESR1*, *AR*, *PRLR*, *FGFR4*, *MKI67*, *CCNB1*, *KIF14*, *PAK1*, *MMR11*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703* и снижение экспрессии *MYC* по сравнению с нормой.

Выводы. Транскрипционная сигнатура при атипичной протоковой гиперплазии имела сходство с таковой при протоковой карциноме *in situ* и люминальных подтипах рака молочной железы.

Ключевые слова: атипичная протоковая гиперплазия молочной железы, предраковые заболевания, рак молочной железы, профили мРНК драйверных генов онкогенеза, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Для цитирования: Бурменская О.В., Кометова В.В., Сметник А.А. и др. Изменение экспрессии мРНК драйверных генов онкогенеза при атипичной протоковой гиперплазии молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2023;19(4):26–35. DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-4-26-35>

Changes in mRNA expression of oncogenesis driver genes in atypical ductal breast hyperplasia

O.V. Burmenskaya, V.V. Kometova, A.A. Smetnik, V.V. Rodionov, D. Yu. Trofimov, L.A. Ashrafyanyan, 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: Olga Vladimirovna Burmenskaya bourmenska@mail.ru

Background. Atypical ductal hyperplasia is a relatively common breast lesion that increases the risk of breast cancer by 3.5 to 5 times. Genomic rearrangements underlying the development of atypical proliferative lesions and breast cancer lead to gene expression changings.

Aim. To determine the mRNA expression profile of neoplasia and oncogenesis driver genes in atypical ductal hyperplasia of the breast.

Materials and methods. The real-time reverse transcription polymerase chain reaction was used to explore the expression profile of 46 genes in 107 samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens from atypical ductal hyperplasia, ductal hyperplasia without atypia, ductal carcinoma *in situ* and normal breast tissue.

Results. In atypical ductal hyperplasia, we detected changes in the expression of 22 of 46 studied genes, including *ESR1*, *AR*, *PRLR*, *FGFR4*, *MKI67*, *CCNB1*, *KIF14*, *PAK1*, *MMP11*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, which were upregulated, and *MYC*, which was downregulated.

Conclusion. The transcriptional signature of atypical ductal hyperplasia was similar to that of ductal carcinoma *in situ* and breast cancer of luminal subtypes.

Keywords: atypical ductal hyperplasia of the breast, premalignant condition, breast cancer, mRNA profiles of oncogenic driver genes, real-time reverse transcription polymerase chain reaction

For citation: Burmenskaya O.V., Kometova V.V., Smetnik A.A. et al. Changes in mRNA expression of oncogenesis driver genes in atypical ductal breast hyperplasia. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy = Tumors of female reproductive system* 2023;19(4):26–35. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.17650/1994-4098-2023-19-4-26-35>

Введение

Атипичная гиперплазия молочной железы характеризуется аномальными пролиферативными процессами в ткани молочной железы, не достигшими столь значимых изменений, чтобы их можно было классифицировать как протоковую карциному *in situ* (ductal carcinoma *in situ*, DCIS). Атипичная гиперплазия является предраковым заболеванием и может возникать как в протоковом, так и в дольковом эпителии. Оба этих типа гиперплазии — атипичная протоковая гиперплазия (atypical ductal hyperplasia, ADH) и атипичная дольковая гиперплазия (atypical lobular hyperplasia, ALH) — объединяются общим термином «неоплазия молочной железы».

В ряде случаев бывает крайне трудно различить ADH и DCIS, поскольку патоморфологические критерии этих 2 патологических состояний схожи, особенно когда это касается небольшого фокуса пролиферации атипичных клеток. Поэтому в 2011 г. рабочая группа Всемирной организации здравоохранения рекомендовала пользоваться 2 критериями: при вовлечении в патологический процесс <2 протоков и/или при размере патологического фокуса <2 мм предпочтение следует отдавать диагнозу ADH [1].

Атипичная протоковая гиперплазия является относительно распространенным поражением, которое диагностируется у 5–20 % женщин при биопсии молочной железы [2–4]. По данным аутопсий вероятность обнаружения атипичной гиперплазии оказалась еще выше и достигла 50 % [5].

Данные 2 крупных метаанализов, опубликованных в 2015 и 2018 г., демонстрируют, что доброкачественные заболевания молочных желез с атипичной гиперплазией увеличивают риск развития рака молочной железы (РМЖ) в 3,5–5,0 раза [6, 7]. Пожизненный риск развития РМЖ у пациенток с ADH составляет 15–20 % [8].

В основе развития атипичных пролиферативных процессов и РМЖ лежат изменения в структуре генома, следствием которых становится изменение экспрессии генов. Ранее в своей работе мы использовали панель из 45 генов для определения экспрессии их мРНК при РМЖ, в том числе с целью дальнейшей молекулярно-генетической классификации подтипов

РМЖ [9]. Помимо 4 маркеров (Ki-67, ESR, PGR и HER2/neu), используемых в рутинной иммуногистохимии при РМЖ, нами были исследованы и другие коэкспрессированные с ними или регулируемые ими гены, которые рассматриваются в различных публикациях как «драйверы-промоутеры» онкогенеза. Особенности их экспрессии и их роль в патогенезе атипичных пролиферативных поражений и РМЖ мы хотели бы обсудить в данной работе.

Цель настоящего исследования состояла в определении профиля экспрессии мРНК драйверных генов неоплазии и онкогенеза при ADH молочной железы.

Материалы и методы

Методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени исследовано 107 образцов фиксированных в формалине и парафинизированных (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) тканей молочной железы, полученных в результате хирургического вмешательства в отделении патологии молочной железы ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова» Минздрава России. Подбор и подготовка образцов для молекулярно-генетического исследования выполнены патоморфологом по результатам гистологического исследования. В сравнительном аспекте исследовано 20 образцов ADH, 40 образцов протоковой гиперплазии без атипии (typical ductal hyperplasia, TDH), 22 образца DCIS и 25 образцов гистологически нормальной ткани, полученных после редукционной (уменьшающей) маммопластики.

При выделении РНК проводили предварительную обработку образцов протеиназой К и последующее выделение РНК методом спиртовой преципитации с помощью наборов «Проба-ПК» и «Проба-НК» (ООО «НПФ ДНК-Технология», Россия). Далее последовательно выполняли реакцию обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в 2 повторах для каждого анализанта на приборе «ДТпрайм» (реактивы и приборы производства ООО «НПФ ДНК-Технология» (Россия)). Исследования проведены в соответствии с методикой, опубликованной нами ранее [9].

Панель генов включала 46 маркеров: *ESR1*, *PGR*, *AR*, *PRLR* (рецепторы гормонов), *ERBB2/HER2neu*, *GRB7*, *FGFR4*, *EGFR* (рецепторы ростовых факторов), *MKI67*, *MYBL2*, *CCNB1*, *AURKA*, *BIRC5*, *CCND1*, *CCNE1*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PPP2R2A*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TMEM45A*, *TPX2*, *ANLN*, *TPT1* (гены пролиферации, митоза, регуляции клеточного цикла и формирования веретена деления), *CTSV/CTSL2*, *EMSY*, *PAK1*, *MMP11* (миграция, инвазия, организация цитоскелета), *PTEN*, *SFRP1* (супрессоры опухолей), *BCL2*, *BAG1* (апоптоз), *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *MYC* (факторы транскрипции), *TYMS*, *EXO1* (репликация и репарация ДНК), *SCGB2A2*, *KRT5*, *MIA* (дифференцировка клеток), *CD274/PD-L1*, *TRAC*, *CD68* (иммунитет), *NAT1* (ген ариламин-N-ацетилтрансферазы), *UBE2T* (ген убиквитинирования белков), а также 2 референсных гена: *B2M* и *GUSB*. Дополнительно к ранее использованной панели, включающей 45 генов, исследована экспрессия мРНК рецептора пролактина *PRLR*.

Транскрипционный профиль генов определяли методом мультиплексной обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием праймеров и флуоресцентно-меченных проб (Fam, Cy5), специфичных к последовательностям определяемых мРНК без амплификации на матрице геномной ДНК.

Оценку уровня экспрессии мРНК осуществляли методом ΔC_p с расчетом на нормировочный фактор (среднее значение (C_p) референсных генов *B2M*, *GUSB* и *HPRT1*) и уровень экспрессии в контрольной группе (норма), который принимался равным 1.

Статистический анализ. Анализ результатов осуществляли с помощью таблиц Microsoft Excel и пакета программ IBM SPSS Statistics 17.0. Соответствие анализируемых параметров закону нормального распределения оценивали в тесте Шапиро–Уилка. В связи с несоответствием исследованных показателей критериям нормального распределения для сравнения данных применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. В качестве меры центральной тенденции в группах исследования рассчитывали медиану (Me), учитывали также межквартильный размах [Q1, Q3]. Статистически значимыми считали различия при уровне $p < 0,05$. Если значение p было меньше 0,001, указывали $p < 0,001$.

Результаты

Наиболее выраженные изменения экспрессии мРНК по сравнению с нормальной тканью выявлены для DCIS: при DCIS установлено изменение экспрессии 32 из 46 исследованных генов, из них экспрессия мРНК 26 генов (*ESR*, *AR*, *PRLR*, *ERBB2*, *FGFR4*, *MKI67*, *CCNB1*, *AURKA*, *CDKN2A*, *KIF14*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TMEM45A*, *TPX2*, *ANLN*, *CTSL2*, *PAK1*, *MMP11*, *GATA3*, *FOXA1*, *TYMS*, *EXO1*, *CD274*, *CD68*, *NAT1*, *UBE2*) была

статистически значимо выше в 1,5–9,7 раза, а экспрессия 6 генов (*EGFR*, *TPT1*, *EMSY*, *SFRP1*, *MYC*, *KRT5*) – ниже в 1,3–11,7 раза (см. таблицу).

Аналогичные изменения в экспрессии генов отмечены и для АДН: при АДН установлено изменение экспрессии 22 из 46 исследованных генов, из них экспрессия мРНК 21 гена (*ESR*, *AR*, *PRLR*, *FGFR4*, *MKI67*, *CCNB1*, *KIF14*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*, *PAK1*, *MMP11*, *GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*, *TYMS*, *EXO1*, *CD274*, *CD68*, *NAT1*) была статистически значимо выше в 1,5–10,4 раза, а экспрессия мРНК 1 гена (*MYC*) – ниже в 1,8 раза (см. таблицу). При этом в группе АДН наблюдались тенденция к повышению экспрессии мРНК для генов *AURKA*, *CDKN2A*, *TMEM45A*, *CTSL2*, *UBE2* и тенденция к снижению экспрессии для генов *TPT1*, *EMSY*, *SFRP1*, однако эти различия по сравнению с нормальной тканью не достигли уровня статистической значимости. В группе DCIS также отмечалась тенденция к повышению экспрессии мРНК гена *ZNF703* в 1,5 раза ($p = 0,067$).

Профиль экспрессии мРНК по меньшей мере 21 гена был идентичным для групп АДН и DCIS и статистически значимо отличался от такового нормальной ткани молочной железы (см. рисунок).

Для ТДН отмечены некоторые аналогичные с АДН и DCIS изменения в экспрессии генов (см. таблицу и рисунок). При ТДН для 12 генов отмечено статистически значимое по сравнению с нормальной тканью повышение экспрессии мРНК в 1,4–2,7 раза (*ESR*, *AR*, *FGFR4*, *TMEM45B*, *MMP11*, *GATA3*, *FOXA1*, *CD68*, *NAT1*) или тенденция к ее повышению (*PRLR*, *CCNB1*, *ZNF703*), а для 4 генов – статистически значимое снижение экспрессии мРНК (*TPT1*, *MYC*, *PTEN* – в 3,7; 2,1 и 2,1 раза соответственно) или тенденция к ее снижению (*EMSY*, $p = 0,055$). В отличие от АДН и DCIS, в группе ТДН отмечены статистически значимое повышение уровня экспрессии мРНК гена *MIA* в 1,9 раза ($p = 0,023$) и снижение экспрессии мРНК генов *CCND1* в 1,5 раза ($p = 0,028$) и *CCNE1* в 1,7 раза ($p = 0,044$).

При дискриминации образцов DCIS и АДН согласно предложенной нами ранее модели классификации молекулярно-генетических подтипов РМЖ значительная часть образцов классифицировалась как опухоли люминальных подтипов. Из группы АДН ($n = 20$) транскрипционный профиль 6 (30 %) образцов был подобен таковому люминального А подтипа, 2 (10 %) – люминального В ERBB2-отрицательного, 1 (5 %) – люминального В ERBB2-положительного, остальные 11 (55 %) образцов были подобны норме. Из группы DCIS ($n = 22$) транскрипционный профиль 11 (50 %) образцов был подобен таковому люминального А подтипа, 2 (9,1 %) – люминального В ERBB2-отрицательного, 3 (13,6 %) – люминального В ERBB2-положительного, 1 (4,5 %) – ERBB2-обогащенного, остальные 5 (22,7 %) образцов были подобны норме.

Статистические показатели, характеризующие уровни экспрессии мРНК исследованных генов при гиперпролиферативных заболеваниях молочной железы

Statistical indicators characterizing the levels of mRNA expression of research genes in hyperproliferative breast diseases

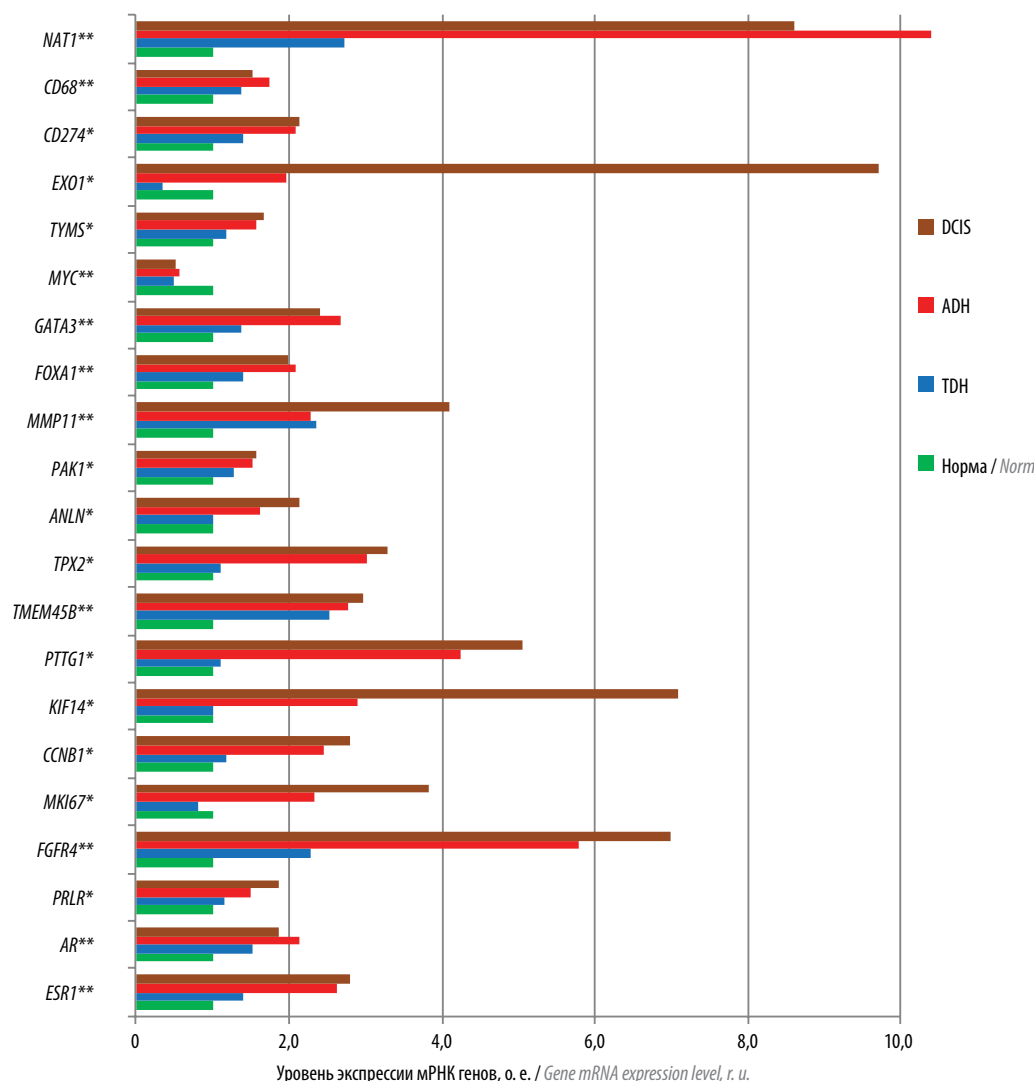
Ген Gene	Норма Norm	TDH		ADH		DCIS	
	n = 25	n = 40		n = 20		n = 22	
	Me [1Q; 3Q]	Me [1Q; 3Q]	p	Me [1Q; 3Q]	p	Me [1Q; 3Q]	p
Рецепторы гормонов и факторов роста Hormone and growth factor receptors							
ESR1	1,0 [0,6; 1,4]	1,4 [0,9; 2,1]	0,020	2,6 [1,1; 3,9]	0,001	2,8 [1,1; 4,2]	0,001
PGR	1,0 [0,5; 1,7]	0,8 [0,4; 1,3]	0,577	0,9 [0,4; 1,6]	0,828	0,7 [0,3; 1,2]	0,098
AR	1,0 [0,7; 1,4]	1,5 [1,0; 2,4]	0,006	2,1 [1,2; 3,5]	0,002	1,9 [0,9; 2,9]	0,009
PRLR	1,0 [0,9; 1,2]	1,1 [0,8; 1,8]	0,051	1,5 [1,0; 2,5]	0,008	1,9 [1,2; 3,4]	<0,001
ERBB2/HER2	1,0 [0,9; 1,4]	1,4 [0,8; 1,7]	0,143	1,0 [0,8; 1,6]	0,766	1,6 [1,1; 2,6]	0,001
GRB7	1,0 [0,8; 1,4]	1,1 [0,7; 1,5]	0,485	1,0 [0,7; 1,4]	0,890	1,3 [0,9; 2,4]	0,093
FGFR4	1,0 [0,6; 2,2]	2,3 [1,1; 5,5]	0,003	5,8 [3,0; 9,6]	<0,001	7,0 [3,3; 11,9]	<0,001
ERBB1/EGFR	1,0 [0,7; 1,5]	0,9 [0,7; 1,4]	0,624	0,9 [0,6; 1,2]	0,396	0,5 [0,4; 0,8]	0,001
Пролиферация и регуляция клеточного цикла Proliferation and cell cycle regulation							
MKI67	1,0 [0,5; 2,3]	0,8 [0,2; 1,6]	0,567	2,3 [1,6; 3,2]	0,034	3,8 [2,7; 4,6]	<0,001
MYBL2	1,0 [0,4; 1,2]	0,5 [0,3; 0,7]	0,069	0,6 [0,4; 0,9]	0,443	0,9 [0,7; 2,2]	0,353
CCNB1	1,0 [0,7; 1,4]	1,2 [0,7; 2,9]	0,150	2,4 [1,9; 3,3]	<0,001	2,8 [2,1; 3,3]	<0,001
AURKA	1,0 [0,9; 1,6]	1,3 [0,9; 2,2]	0,581	1,7 [1,0; 2,3]	0,058	2,0 [1,4; 2,5]	0,002
BIRC5	1,0 [0,4; 2,4]	1,1 [0,6; 2,2]	0,638	0,9 [0,5; 2,1]	0,871	1,5 [1,0; 2,4]	0,221
CCND1	1,0 [0,8; 1,2]	0,7 [0,5; 1,0]	0,028	0,9 [0,7; 2,4]	0,723	1,3 [0,8; 1,6]	0,062
CCNE1	1,0 [0,4; 1,8]	0,6 [0,3; 0,9]	0,044	0,6 [0,4; 0,8]	0,192	0,6 [0,4; 0,9]	0,114
CDKN2A	1,0 [0,7; 1,6]	1,1 [0,8; 1,7]	0,270	1,2 [0,9; 1,6]	0,199	1,5 [1,1; 2,2]	0,016
KIF14	1,0 [1,0; 1,0]	1,0 [1,0; 2,7]	0,853	2,9 [1,0; 6,8]	0,034	7,1 [1,0; 10,5]	0,003
PPP2R2A	1,0 [0,8; 1,3]	0,9 [0,7; 1,1]	0,204	1,3 [0,9; 1,6]	0,211	1,0 [0,7; 1,3]	0,906
PTTG1	1,0 [0,8; 1,5]	1,1 [0,5; 2,2]	0,951	4,2 [2,3; 6,9]	<0,001	5,0 [3,8; 6,6]	<0,001
TMEM45B	1,0 [0,3; 1,5]	2,5 [1,4; 4,1]	<0,001	2,8 [1,1; 4,4]	0,001	3,0 [1,6; 6,5]	<0,001
TMEM45A	1,0 [0,6; 1,4]	0,9 [0,5; 1,5]	0,664	1,6 [0,9; 2,4]	0,102	1,5 [1,0; 2,6]	0,027
TPX2	1,0 [0,6; 1,9]	1,1 [0,6; 2,5]	0,929	3,0 [1,8; 4,2]	<0,001	3,3 [2,4; 5,0]	<0,001
ANLN	1,0 [0,5; 1,5]	1,0 [0,6; 1,6]	0,934	1,6 [1,0; 2,3]	0,049	2,1 [1,7; 3,5]	0,001
TPT1	1,0 [0,3; 1,5]	0,3 [0,1; 0,4]	<0,001	0,1 [0,1; 3,1]	0,083	0,1 [0,1; 0,4]	0,012
Миграция, организация цитоскелета, инвазия Migration, cytoskeletal organization, invasion							
CTSL2	1,0 [0,8; 1,7]	1,2 [0,9; 1,8]	0,215	1,5 [1,0; 2,6]	0,079	1,6 [1,3; 2,2]	0,016
EMSY	1,0 [0,8; 1,2]	0,8 [0,7; 1,1]	0,055	0,9 [0,7; 1,0]	0,179	0,8 [0,7; 0,9]	0,026
PAK1	1,0 [0,8; 1,3]	1,3 [0,7; 1,9]	0,292	1,5 [1,2; 2,2]	0,001	1,6 [1,3; 2,1]	0,001

Окончание таблицы
End of the table

Ген Gene	Норма Norm	TDH		ADH		DCIS	
	n = 25	n = 40		n = 20		n = 22	
	Me [1Q; 3Q]	Me [1Q; 3Q]	p	Me [1Q; 3Q]	p	Me [1Q; 3Q]	p
MMP11	1,0 [0,3; 1,6]	2,4 [1,1; 4,0]	0,002	2,3 [1,2; 4,3]	0,002	4,1 [2,1; 7,8]	<0,001
Супрессоры опухолей Tumor suppressors							
PTEN	1,0 [0,5; 1,6]	0,5 [0,4; 0,6]	0,004	0,7 [0,5; 0,9]	0,107	0,6 [0,5; 0,7]	0,058
SFRP1	1,0 [0,6; 1,3]	0,8 [0,6; 1,7]	0,831	0,8 [0,5; 1,0]	0,084	0,3 [0,2; 0,5]	<0,001
Апоптоз Apoptosis							
BCL2	1,0 [0,5; 1,5]	1,0 [0,7; 1,5]	0,704	1,0 [0,7; 1,5]	0,723	0,8 [0,6; 0,9]	0,248
BAG1	1,0 [0,8; 1,1]	0,9 [0,6; 1,4]	0,664	1,1 [0,8; 1,3]	0,528	1,0 [0,7; 1,5]	0,765
Факторы транскрипции Transcription factors							
GATA3	1,0 [0,7; 1,3]	1,4 [0,9; 2,5]	0,025	2,7 [1,3; 3,8]	0,001	2,4 [1,5; 3,9]	<0,001
FOXA1	1,0 [0,8; 1,4]	1,4 [1,2; 2,0]	0,005	2,1 [1,3; 3,4]	0,002	2,0 [1,4; 3,6]	<0,001
ZNF703	1,0 [0,6; 1,8]	2,1 [0,9; 3,2]	0,090	2,7 [1,2; 4,3]	0,014	1,8 [0,8; 3,6]	0,067
MYC	1,0 [0,8; 1,1]	0,5 [0,3; 0,8]	0,001	0,6 [0,4; 0,8]	0,006	0,5 [0,3; 0,7]	<0,001
Репликация и репарация ДНК DNA replication and repair							
TYMS	1,0 [0,8; 2,1]	1,2 [0,9; 1,7]	0,664	1,6 [1,3; 2,2]	0,039	1,7 [1,4; 2,4]	0,034
EXO1	1,0 [0,3; 1,6]	0,4 [0,3; 1,2]	0,338	2,0 [0,4; 8,5]	0,032	9,7 [5,0; 15,7]	<0,001
Дифференцировка клеток Cell differentiation							
SCGB2A2	1,0 [0,7; 2,3]	1,9 [0,8; 4,4]	0,160	1,1 [0,5; 2,7]	0,991	0,9 [0,4; 4,6]	0,932
KRT5	1,0 [0,7; 1,3]	1,2 [1,0; 2,1]	0,069	1,1 [0,6; 1,7]	0,714	0,6 [0,4; 1,0]	0,018
MIA	1,0 [0,8; 1,6]	1,9 [0,9; 3,7]	0,023	1,7 [1,0; 2,3]	0,097	1,2 [0,7; 2,0]	0,717
Иммунитет, воспаление Immunity, inflammation							
CD274/PD-L1	1,0 [0,7; 1,9]	1,4 [0,7; 2,0]	0,415	2,1 [1,3; 3,3]	0,008	2,1 [1,6; 2,7]	0,003
TRAC	1,0 [0,7; 1,3]	0,8 [0,4; 1,1]	0,092	0,8 [0,6; 1,1]	0,238	1,1 [0,7; 1,5]	0,514
CD68	1,0 [0,8; 1,3]	1,4 [0,9; 1,9]	0,043	1,7 [1,3; 2,3]	0,001	1,5 [1,3; 2,1]	<0,001
Другое Other							
NAT1	1,0 [0,3; 1,4]	2,7 [1,4; 5,3]	<0,001	10,4 [7,1; 14,4]	<0,001	8,6 [5,3; 12,4]	<0,001
UBE2T	1,0 [0,7; 1,7]	1,0 [0,4; 1,8]	0,591	1,6 [0,9; 2,4]	0,114	2,0 [1,3; 2,5]	0,005

Примечание. TDH – протоковая гиперплазия без атипии; ADH – атипичная протоковая гиперплазия; DCIS – протоковая карцинома in situ.

Note. TDH – typical ductal hyperplasia; ADH – atypical ductal hyperplasia; DCIS – ductal carcinoma in situ.



Изменение экспрессии мРНК генов, достигших уровня статистической значимости, в группах ADH и DCIS одновременно. TDH — протоковая гиперплазия без атипии; ADH — атипичная протоковая гиперплазия; DCIS — протоковая карцинома *in situ*. *Статистически значимые различия в группах TDH, ADH, DCIS по сравнению с нормой. **Статистически значимые различия в группах ADH, DCIS по сравнению с нормой

Changes in the expression of mRNA of genes that reached the level of statistical significance in the ADH and DCIS groups simultaneously. TDH — typical ductal hyperplasia; ADH — atypical ductal hyperplasia; DCIS — ductal carcinoma *in situ*. *Statistically significant differences in the TDH, ADH, DCIS groups compared to the norm. **Statistically significant differences in the ADH, DCIS groups compared to the norm

И только в 1 (2,5 %) образце из группы TDH ($n = 40$) экспрессионный профиль был подобен таковому люминального А подтипа РМЖ.

Обсуждение

В нашей работе основной акцент был сделан на ADH. Исследований молекулярно-генетических особенностей ADH не так много, но и они имеют ряд ограничений, поскольку большинство из них были выполнены на небольшом количестве образцов с использованием метода сравнительной геномной гибридизации, метода оценки потери гетерозиготности по микросателлитам и метода флуоресцентной гибридизации *in situ*. Зачастую разделение ADH и ALH не проводилось. В обзорной публикации D.N. Danforth

очень хорошо представлены результаты этих исследований, содержащих информацию о выявленных числовых и структурных хромосомных изменениях, о метилировании ДНК и нарушениях экспрессии генов при ADH и ALH. Основной вывод, который делает автор, состоит в том, что хромосомные изменения, наблюдаемые при атипичной гиперплазии, аналогичны присутствующим при РМЖ и согласуются с предположением, что ADH является предопухолевым поражением и частью непрерывного процесса патологических изменений на пути к РМЖ [10].

Все хромосомные изменения могут быть отнесены к разным по времени событиям в ряду неопластической трансформации. Исследуя 15 генов опухолевых супрессоров (*TP53*, *RB1*, *BRCA1* и др.), Р. О'Connell

и соавт. установили потерю гетерозиготности хотя бы в 1 из локусов в 42 % случаев ADH, предполагая, что инактивация этих опухолевых генов-супрессоров может быть ранним неопластическим событием, связанным с последующим развитием инвазивной протоковой карциномы (invasive ductal carcinoma, IDC) [11].

Сравнивая хромосомные перестройки в образцах ADH, DCIS и IDH, другие исследователи нашли как похожие генетические изменения (и отнесли их к ранним), так и уникальные для каждого поражения (и отнесли их к поздним). К «горячим точкам» в раннем развитии РМЖ они отнесли потерю фрагментов длинного плеча 16-й хромосомы (16q) и короткого плеча 17-й хромосомы (17p) [12], амплификацию фрагмента длинного плеча 17-й хромосомы (17q) [13], амплификацию фрагмента длинного плеча 1-й хромосомы 1q [14]. Напротив, амплификация фрагмента короткого плеча 19-й хромосомы (19p) и потери фрагментов короткого плеча 2-й хромосомы (2p), 11-й хромосомы (11p), а также фрагментов длинного плеча 6-й хромосомы (6q), 12-й хромосомы (12q), 22-й хромосомы (22q) и X-хромосомы (Xq) присутствуют только при DCIS и IDC. Эти изменения позволяют предположить, что данные хромосомные перестройки могут быть более поздними событиями в прогрессировании РМЖ [13].

Следствием этих хромосомных перестроек является изменение экспрессии генов. Результатом амплификации становится сверхэкспрессия генов, например гена *ERBB2/HER2neu* (локация 17q12); результатом потери — уменьшение или отсутствие экспрессии, например гена *TP53* (локация 17p13.1).

Анализируя собственные результаты, прежде всего мы обратили внимание на гормонозависимую активацию пролиферации, а также на сходство транскрипционного профиля генов при ADH с таковым при DCIS и люминальных подтипах инвазивной карциномы молочной железы, экспрессионные профили которых описаны нами ранее [9]. Транскрипционный профиль генов при ADH характеризовался повышением экспрессии мРНК генов рецепторов гормонов (*ESR1*, *AR*, *PRLR*), транскрипционных факторов (*FOXA1*, *GATA3*, *ZNF703*), маркеров пролиферации (*MKI67*, *CCNB1*, *KIF14*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*), репликации ДНК (*TYMS*, *EXO1*), адгезии, миграции и инвазии клеток (*PAK1*, *MMP11*).

Полученные нами результаты согласуются с данными целого ряда публикаций. В работе A.D. Sahar и соавт. на основе анализа молекулярного ландшафта ADH также прослежена связь ADH с DCIS и инвазивной карциномой [15].

K.J. Gregory и соавт. в парных сравнениях экспрессии в тканях нормальной молочной железы и атипичной гиперплазии обнаружили 1039 дифференциально экспрессируемых генов. Они наблюдали повышение экспрессии мРНК генов, включенных в нашу панель:

генов рецепторов эстрогенов *ESR1*, андрогенов *AR* и пролактина *PRLR*, рецептора эпидермального фактора роста *ERBB2*, транскрипционных факторов *FOXA1*, *GATA3*, *ZNF703*, снижение экспрессии мРНК генов цитокератина *KRT5* и супрессора опухолей *SFRP1* [16]. В нашем исследовании также получены данные о статистически значимом повышении уровня экспрессии мРНК генов *ESR1*, *AR*, *PRLR*, *FOXA1*, *GATA3*, *ZNF703* при ADH, а снижение экспрессии мРНК генов *KRT5* и *SFRP1* достигло уровня статистической значимости только при DCIS. Для ADH отмечена только тенденция к снижению экспрессии мРНК гена *SFRP1* ($p = 0,084$).

На основании полученных различий K.J. Gregory и соавт. пришли к выводу о том, что с развитием ADH связаны скоординированные изменения в передаче сигналов через рецепторы эстрогенов, рецепторы эпидермального фактора роста и рецепторы андрогенов, а также что в процессе неопластической трансформации могут быть задействованы сигнальные пути, регулируемые секретиремым протеином *SFRP1*. Члены этого семейства действуют как растворимые модуляторы передачи сигналов через Wnt, а эпигенетическое молчание генов *SFRP* приводит к нарушению регуляции активации Wnt-пути. Нокдаун гена *SFRP1* в клеточной линии нормального эпителия молочной железы 76N-Tert привел к аналогичным, наблюдаемым при атипичной гиперплазии, изменениям экспрессии по меньшей мере 13 генов, включая повышение экспрессии мРНК гена *FOXA1* [16].

В более ранней публикации A.L. Brunner и соавт. в поиске «ключевых драйверов» прогрессирования ADH до РМЖ сравнили и охарактеризовали транскрипционные различия в нормальных тканях, тканях ADH и опухолей (DCIS/IDC) молочной железы у 16 пациентов [17]. Как и в нашем исследовании, они обнаружили проонкогенную сигнатуру экспрессии генов при ранней неоплазии, включая повышенную экспрессию *ERBB2*, *FOXA1* и *GATA3*. При этом сверхэкспрессию мРНК *ERBB2* они не связали с обязательной амплификацией этого гена и предположили, что *ERBB2* может играть роль на ранних стадиях развития РМЖ независимо от амплификации гена.

Один из механизмов неопластической трансформации может осуществляться через пролактин (PRL), рецепторы пролактина и p21-активированную киназу *PAK1*. Повышенная экспрессия мРНК генов *PRLR* и *PAK1* выявлена нами при ADH. Полагают, что PRL способствует как дифференцировке молочных желез, так и онкогенезу [18]. Несмотря на усилия по обнаружению клеточных путей, регулирующих метастазирование РМЖ, мало что известно о том, как PRL взаимодействует с внеклеточной средой и белками цитоскелета и регулирует подвижность опухолевых клеток. В работе A. Hammer и M. Diakonova *PAK1* представлена как новая

мишень для PRL-активированной янус-киназы 2 (JAK2) [19]. JAK2-зависимое фосфорилирование тирозина PAK1 играет критическую роль в регуляции активности PAK1. Тирозинфосфорилированная PAK1 обеспечивает обретение клетками PRL-зависимой подвижности с помощью образования комплексов паксиллин/GIT1/ β PIX/pTyr-PAK1, способствующих адгезии, и фосфорилированию актин-связывающего белка филамин А. Повышенная адгезия обеспечивает миграцию клеток, а фосфорилированный филамин А стимулирует киназную активность PAK1 и увеличивает актин-регулирующую активность, способствуя подвижности клеток. Помимо этого тирозинфосфорилированная PAK1 стимулирует инвазию опухолевых клеток посредством транскрипции и секреции MMP-1 и MMP-3 MAPK-зависимым образом. Таким образом, сложное взаимодействие между PRL и клеточным микроокружением может предполагать ключевую роль сигнальных путей PRL/PAK1 как в неоплазии, так и в более позднем метастазировании PMЖ [19]. Статистически значимое повышение экспрессии мРНК маркеров инвазии *PAK1* при АДН и *MMP11* при ТДН и АДН не было прогнозируемым, исходя из ожидания, что миграция и метастазирование должны быть более поздними событиями в ряду опухолевой трансформации. Возможно, изменения адгезивных и миграционных свойств клеток при гиперплазиях способствуют формированию новых типов клеточных образований с другими «правилами выживания» и взаимодействиями с микроокружением.

Еще один из механизмов неопластической трансформации может осуществляться через рецепторы фактора роста фибробластов FGFR4, повышенная экспрессия которых отмечена нами как при АДН и DCIS, так и при ТДН. Аберрантная активация FGFR4 может быть следствием генетических изменений. При исследовании 4853 опухолей Т. Helsten и соавт. обнаружили абберации FGFR в 7,1 % случаев [20]. Полагают, что способность EGFR4 переключать специфичность связывания лиганда посредством альтернативного сплайсинга петли III в структуре рецептора облегчает эпителиально-мезенхимальный переход и ассоциирована с прогрессированием и инвазией опухоли. Взаимодействие FGFR4 с лигандом приводит к STAT1/3-зависимой передаче сигналов, а также к активации

нескольких сигнальных путей, включая RAS-RAF-MAPK-, PI3K-AKT-, Wnt/GSK-3 β / β -катенин-, MST1/2-каскады, что приводит к росту опухоли и уходу от апоптоза [21].

Особого внимания в нашем исследовании заслуживал тот факт, что по меньшей мере 45 % образцов с АДН имели выраженную проонкогенную сигнатуру и классифицировались как молекулярные подтипы инвазивного PMЖ, т.е. фактически имели онкогенные сигнатуры экспрессии генов, характерные для люминального А (30 %), люминального В ERBB2-отрицательного (10 %), а также люминального В ERBB2-положительного (1 (5 %) случаев) подтипов. Такая гетерогенность образцов АДН позволяет предположить, что уже на этапе атипичной гиперплазии может быть задана некоторая детерминированность патологической ткани к прогрессированию в направлении определенного подтипа PMЖ. В образце АДН, похожем по профилю экспрессии на люминальный В ERBB2-положительный подтип PMЖ, экспрессия мРНК обоих генов *GRB7* и *ERBB2* была в 12–14 раз выше среднестатистического показателя в нормальной ткани, что скорее свидетельствовало об амплификации обоих генов вследствие их близкого расположения в локусе 12 длинного плеча 17-й хромосомы (17q12). А в образцах DCIS подобные изменения мы наблюдали в 4 случаях.

Выводы

Транскрипционная сигнатура при АДН имела сходство с таковой DCIS и характеризовалась повышением пролиферативной (*MKI67*, *CCNB1*, *KIF14*, *PTTG1*, *TMEM45B*, *TPX2*, *ANLN*) и транскрипционной (*GATA3*, *FOXA1*, *ZNF703*) активности, гормональной рецепции (*ESR1*, *AR*, *PRLR*), рецепции фактора роста (*FGFR4*), маркеров репликации ДНК (*TYMS*, *EXO1*) инвазии (*PAK1*, *MMP11*) и иммунокомпетентных клеток (*CD274*, *CD68*). В 45 % случаев образцы с АДН имели онкогенные сигнатуры, похожие на таковые люминального А (30 %), люминального В ERBB2-отрицательного (10 %), люминального В ERBB2-положительного подтипов (5 %) PMЖ. Экспрессия мРНК генов в группе ТДН имела сходие с таковыми при АДН, но слабо выраженные тенденции, с изменением в уровне экспрессии меньшего числа генов, оставаясь в пределах непроонкогенных профилей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Simpsons J. WHO Classification of Tumors of the Breast. Lyon: IARC Press 2012. Pp. 88, 89.
2. Rubin E., Visscher D.W., Alexander R.W. et al. Proliferative disease and atypia in biopsies performed for nonpalpable lesions detected mammographically. *Cancer* 1988;61:2077–82.
3. Liberman L., Cohen M.A., Dershaw D.D. et al. Atypical ductal hyperplasia diagnosed at stereotaxic core biopsy of breast lesions: an indication for surgical biopsy. *AJR Am J Roentgenol* 1995;164:1111–3.
4. Ioffe O.B., Berg W.A., Silverberg S.G., Kumar D. Mammographic-histopathologic correlation of large-core needle biopsies of the breast. *Mod Pathol* 1998;11:721–7.
5. Friedenreich C., Bryant H., Alexander F. et al. Risk factors for benign proliferative breast disease. *Int J Epidemiol* 2000;29:637–44. DOI: 10.1093/ije/29.4.637
6. 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
7. 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.
8. Myers D.J., Walls A.L. Atypical Breast Hyperplasia. In: StatPearls. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023.
9. 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
10. Danforth D.N. Molecular profile of atypical hyperplasia of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 2018;167(1):9–29. DOI: 10.1007/s10549-017-4488-x
11. O'Connell P., Pekkel V., Allred D.C. et al. Analysis of loss of heterozygosity in 399 premalignant breast lesions at 15 genetic loci. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(9):697–703.
12. Lakhani S., Collins N., Stratton M., Sloane J. Atypical ductal hyperplasia of the breast: clonal proliferation with loss of heterozygosity on chromosomes 16q and 17p. *J Clin Pathol* 1995;48(7):611–5.
13. Gao Y., Niu Y., Wang X. et al. Genetic changes at specific stages of breast cancer progression detected by comparative genomic hybridization. *J Mol Med* 2009;87(2):145–52. DOI: 10.1007/s00109-008-0408-1
14. Larson P.S., de las Morenas A., Cerda S.R. et al. Quantitative analysis of allele imbalance supports atypical ductal hyperplasia lesions as direct breast cancer precursors. *J Pathol* 2006;209(3):307–16. DOI: 10.1002/path.1973
15. Sahar A.D., Wesam M.I., Mohamed S.A. et al. Possible prognostic role of HER2/neu in ductal carcinoma *in situ* and atypical ductal proliferative lesions of the breast. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016;17(8):3733–6.
16. Gregory K.J., Roberts A.L., Conlon E.M. et al. Gene expression signature of atypical breast hyperplasia and regulation by SFRP1. *Breast Cancer Res* 2019;21(1):76. DOI: 10.1186/s13058-019-1157-5
17. Brunner A.L., Li J., Guo X., Sweeney R.T. et al. A shared transcriptional program in early breast neoplasias despite genetic and clinical distinctions. *Genome Biol* 2014;15(5):1–16. DOI: 10.1186/gb-2014-15-5-r71
18. Clevenger C.V., Rui H. Breast cancer and prolactin — new mechanisms and models. *Endocrinology* 2022;163(10):bqac122. DOI: 10.1210/endocr/bqac122
19. Hammer A., Diakonova M. Tyrosyl phosphorylated serine-threonine kinase PAK1 is a novel regulator of prolactin-dependent breast cancer cell motility and invasion. *Adv Exp Med Biol* 2015;846:97–137. DOI: 10.1007/978-3-319-12114-7_5
20. Helsten T., Elkin S., Arthur E. et al. The FGFR landscape in cancer: Analysis of 4,853 tumors by next-generation sequencing. *Clin Cancer Res* 2016;22:259–67. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3212
21. Wesche J., Haglund K., Haugsten E.M. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 2011;437:199–213. DOI: 10.1042/BJ20101603

Вклад авторов

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

Authors' contributions

L.A. Ashrafyan, G.T. Sukhikh: concept and design of the study;
V.V. Rodionov: providing the clinical part of the study, editing the article;
D.Yu. Trofimov: organization and conducting of PCR study;
V.V. Kometova: processing and selection of material;
O.V. Burmenskaya: analysis of the data obtained, writing the article;
A.A. Smetnik: writing the article.

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>
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 НИОКТР 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.