

На правах рукописи

КУДИНОВА Елена Александровна

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В
ОПТИМИЗАЦИИ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА ЗАБОЛЕВАНИЙ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 онкология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва - 2017

Работа выполнена в ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России (директор – академик РАН, профессор Солодкий В.А.)

Научный консультант:

академик РАН, профессор, **Солодкий Владимир Алексеевич**

Официальные оппоненты:

Член-корреспондент РАН, профессор **Кушлинский Николай Евгеньевич**, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория биохимии, заведующий лабораторией

Доктор медицинских наук, профессор **Бяхов Михаил Юрьевич**, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения "Московский клинический научно-практический центр Департамента здравоохранения города Москвы", заместитель директора по онкологии

Доктор биологических наук, профессор **Карпухин Александр Васильевич**, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Медико-генетический научный центр", лаборатория молекулярной генетики сложно наследуемых заболеваний, заведующий лабораторией.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «29» мая 2017 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д.208.081.01 при ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Профсоюзная, д.86.

Автореферат разослан «___» апреля 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор медицинских наук, профессор

З.С. Цаллагова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний у женщин. Заболеваемость РМЖ неуклонно растет, так с 2010 по 2015 гг. прирост составил 16,7% и достиг величины 426,4 на 100 тыс. населения (Каприн А.Д., 2016). Данное заболевание также лидирует как причина смертности от злокачественных новообразований у женщин и составляет 17,1%, обуславливая основную долю онкологической смертности в возрастных группах 40—69 и более 85 лет. Одной из основных проблем остается позднее выявление РМЖ, более 30 % опухолей диагностируется только на III-IV стадии.

Эффективная и экономически рациональная система обследования молочных желез интегрирует современные методы лучевой диагностики – рентгенографии, ультразвукового исследования с доплерографией, магнитно-резонансной и рентгеновской компьютерной томографией. Это позволяет увеличить выявляемость I-II стадии заболевания до 60%. Однако необходимо отметить, что считающаяся в настоящее время золотым стандартом ранней диагностики тактика сочетания лучевых методов и морфологического исследования материала биопсии не всегда является достаточной для точной верификации диагноза. При наличии определенных диагностических признаков, таких как скопление микрокальцинатов, наличие эндофитного компонента внутри кисты, изменение плотности и контуров образования при динамическом наблюдении, не удается полностью исключить злокачественный характер образования (Каприн А.Д., Рожкова Н.И., 2016). Таким образом, в ряде случаев, низкая эффективность методов лучевой и морфологической диагностики реализуется или в многократном повторении маммографического исследования с биопсией, или заканчивается хирургическим лечением, как правило, в объеме секторальной резекции со срочным гистологическим исследованием. Именно для данной категории больных анализ биологических маркеров РМЖ является крайне актуальной задачей, т.к. в основе исследования лежит оценка молекулярных признаков на ранних стадиях малигнизации.

Важным направлением внедрения новых методов диагностики, основанных на молекулярно-генетическом подходе, является создание новых систем дифференциальной диагностики и выявления неблагоприятных прогностических групп. В течение последнего десятилетия исследования экспрессии генов с применением технологии полногеномного экспрессионного анализа на микрочипах привели к пониманию того факта, что РМЖ составляет гетерогенную группу заболеваний имеющих различные молекулярные свойства (Perou С.М., 2000). В

2011 году молекулярные подтипы РМЖ, определяемые на основе анализа экспрессии генов были включены в международное соглашение 2011 г. – St. Gallen International Expert Consensus и предложена технология определения молекулярного фенотипа на основе оценки уровня экспрессии с использованием методов иммуногистохимии (ИГХ) (Goldhirsch A., 2011). Однако дальнейшие исследования показали, что молекулярный фенотип, определяемый ИГХ методом (получившим также наименование «суррогатного» метода) и фенотип, сформированный молекулярно-генетическими методами анализа экспрессии генов, имеют большие расхождения (Allott E.H., 2016). В последнее время методы молекулярного прогноза/диагностики были усовершенствованы и переведены с платформы микрочипов на платформу анализа экспрессии генов методом количественного ПЦР (например, метод PAM50) (Parker J.S., et.al., 2009). Предложенная модель позволяет не только определять молекулярный фенотип, но и оценить риск рецидива в течение 10 лет (risk of relapse score (ROR-S)). Однако оценка риска рецидива в существующих моделях имеет вероятностный характер с большой величиной «серой зоны» и не учитывает варианты возможной адъювантной терапии, а величина ошибки при определении молекулярного фенотипа различными методами позволяет сделать вывод, что они находятся на стадии разработки. Следует также подчеркнуть ограниченность большинства существующих технологий в отношении возможности анализа экспрессии генов в образцах тканей, полученных с применением различных технологий фиксации. Поэтому является актуальным исследование и оптимизация молекулярно-генетических методов анализа экспрессии генов в различных типах образцов ткани РМЖ (ткань молочной железы, полученная после биопсии, «свежая» и архивная (замороженная) ткань после хирургического вмешательства, фиксированная ткань парафиновых блоков и др.) с целью разработки эффективных алгоритмов диагностики, прогноза рецидивирования и оценки молекулярного фенотипа РМЖ.

Цель исследования

Изучение диагностической и прогностической значимости молекулярно-генетического исследования профиля экспрессии генов при заболеваниях молочной железы.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Исследовать тканеспецифичность и особенность экспрессии мРНК маркера - маммаглобина в нормальной, опухолевой ткани и периферической крови при злокачественных и доброкачественных заболеваниях молочной железы.

2. Исследовать зависимость экспрессии профиля генов в ткани рака молочной железы от клинико-морфологических характеристик опухоли.
3. Выявить диагностически значимые молекулярно-генетические маркеры для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований молочной железы.
4. Оптимизировать методику исследования профиля экспрессии генов в парафинизированной ткани рака молочной железы.
5. Провести кластеризацию данных профиля экспрессии генов в ткани рака молочной железы и формирование диагностической панели для определения молекулярного фенотипа опухоли.
6. На основе анализа профиля экспрессии генов методом ПЦР разработать алгоритм использования диагностической панели и сравнить результаты определения молекулярных фенотипов методом ПЦР и иммуногистохимического метода, на образцах парафиновых блоков.
7. Разработать алгоритм использования диагностической панели генов для выявления групп высокого риска рецидивирования у больных с нераспространенными формами рака молочной железы (стадии T1-2, N0-2).

Научная новизна

В ходе выполнения диссертационной работы получены оригинальные результаты, позволяющие оптимизировать молекулярно-генетические методы для диагностики и прогноза заболеваний молочной железы.

Впервые методом ПЦР в реальном времени исследована большая панель экспрессии генов – ключевых регуляторов основных клеточных процессов участвующих в канцерогенезе и прогрессии опухоли. Проведена оценка уровней экспрессии большого количества генов в патологической ткани (доброкачественные и злокачественные новообразования) и окружающей ткани молочной железы – органа, в котором локализуется патологический процесс.

На основании проведенных молекулярно-биологических исследований образцов ткани молочной железы, показано, что спектр генов, включающий определение уровня экспрессии: Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1, позволяет с высокой достоверностью отличить доброкачественную и злокачественную ткань молочной железы в случаях, когда постановка диагноза клинико-радиологическими методами затруднена. Включение этих исследований в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики.

Показано, что органоспецифический маркер – маммаглобин, гиперэкспрессирован в ткани опухоли на ранних стадиях. Исследование мРНК маммаглобина в

периферической крови показало высокую диагностическую чувствительность (до 70%) именно для ранних стадий РМЖ.

Разработан оригинальный метод определения молекулярного фенотипа РМЖ на основании исследования профиля экспрессии генов методом РВ-ПЦР в ткани опухоли, а также эффективный алгоритм выявления неблагоприятных групп прогноза, риска рецидивирования и выбора оптимальной схемы терапии для больных ранними формами РМЖ.

Теоретическая и практическая значимость

Разработан метод, включающий определение уровня экспрессии таких генов, как Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1, в образце ткани молочной железы позволяющий с высокой достоверностью отличить доброкачественную и злокачественную ткань молочной железы в случаях, когда постановка диагноза клинико-радиологическими методами затруднена. Включение этих исследований в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики с 81% до 96%.

На основании полученных результатов разработаны проекты методических рекомендаций «Методологические аспекты комплексной диагностики гиперпролиферативных заболеваний молочной железы» предназначенных для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-генетиков и врачей онкологов.

На основании полученных результатов анализа экспрессионного профиля генов, разработаны для производства и внедрения в практику работы клинико-диагностических лабораторий учреждений онкологического профиля и общей лечебной сети, отечественные тест-системы определения и комплексной оценки уровня экспрессии мРНК 24 генов для определения молекулярных фенотипов РМЖ и выявления неблагоприятных групп прогноза и рецидивирования для больных с нераспространенным раком молочной железы.

Предложенный метод диагностики РМЖ на основании определения тканеспецифического маркера маммаглобина в периферической крови может быть рекомендован для ранней диагностики и мониторинга РМЖ.

Разработан алгоритм использования оригинального набора реагентов определения молекулярных фенотипов РМЖ на основе ПЦР метода определения экспрессии комплекса генов в парафиновых блоках.

Положения, выносимые на защиту

1. Анализ экспрессии комплекса генов, отвечающих за функционально важные процессы в опухолевой ткани: контроль пролиферации, апоптоз, дифференцировка и клеточное взаимодействие позволяет с высокой достоверностью дифференцировать доброкачественные и злокачественной новообразования молочной железы.
2. Ткань молочной железы в органе, пораженном злокачественной опухолью, имеет отличный профиль экспрессии от ткани молочной железы с доброкачественными новообразованиями. Это может отражать как компенсаторные, локальные противоопухолевые механизмы, так и системные паранеопластические процессы.
3. Тканеспецифический маркер молочной железы - маммаглобин гиперэкспрессирован при ранних стадиях РМЖ. Определение мРНК маммаглобина в периферической крови можно использовать для ранней диагностики РМЖ.
4. На основе анализа экспрессии сформированного профиля генов в ткани РМЖ получены эффективные модели прогноза рецидивирования, что способствует индивидуализации планирования программ лечения при ранних стадиях РМЖ.
5. Использование оптимально подобранных генов, на основании определения их экспрессии методом ПЦР и математического анализа, позволяет сформировать оптимальный алгоритм для определения молекулярного фенотипа РМЖ.

Внедрение результатов исследования

Разработанные в ходе выполнения исследования тест – системы определения молекулярных фенотипов РМЖ и выявления неблагоприятных групп прогноза и рецидивирования проходят регистрацию в Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Разработан проект методических рекомендаций «Методологические аспекты комплексной диагностики гиперпролиферативных заболеваний молочной железы».

Апробация работы

Материалы работы доложены на международных и российских конференциях и съездах: IV Съезд Научного общества специалистов клинической лабораторной диагностики России. Научно-практическая конференция "Лабораторная наука - практике: первое десятилетие XXI века"- Москва 2010 г., 4th WIN Symposium, WIN 2012 June 28-29, Annals of oncology Paris, France 2012 г., Int.Congress

Gynaecology and Obstetrics Guanchou, China 2012 г., «Медицина молочной железы»» 24-26 февр. Москва 2012 г., «Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторной медицины» 26–28 марта, Москва 2013 г., VIII съезд онкологов и радиологов СНГ и Евразии, 16-18 сентября 2014 г., III Междисциплинарный форум «Медицина молочной железы» Москва 23–24 мая 2014 г, Circulating biomarkers Boston, USA 24-25 March 2014, XVIII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России» 1 – 3 октября 2014г., «Национальные дни лабораторной медицины России» Москва 23 - 25 сентября 2015 г., XXXI International Congress of the IAP and 28th Congress of the ESP, Cologne, Germany 25 - 29 September 2016.

Апробация работы состоялась на совместном заседании Ученого совета и научно-практической конференции ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России 20 мая 2016 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 54 печатных работы, из них: 37 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 1 заявка на изобретение, 2 технологии.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 280 страницах, содержит главы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, практические рекомендации, выводы, список литературы, цитирующий 41 отечественных и 329 зарубежных авторов, 1 приложение. Диссертация иллюстрирована 100 таблицами и 47 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Обследование, морфологическое исследование и лечение пациентов осуществлялось в профильных клинических подразделениях ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России согласно утвержденным клиническим протоколам. Всего в исследование включены 764 пациентки, проходивших лечение в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России в период с 2000 по 2015 г., из них для 595 пациенток проведен анализ оценки уровня экспрессии комплекса генов методом ПЦР в реальном времени. Для каждой пациентки были проанализированы образцы как патологической, так и удаленной от опухолевого узла ткани (морфологически неизменной) молочной железы. В большей части образцов была исследована экспрессия 24 генов (21 функциональный и 3 контрольных), что с учетом дублей (все исследования выполнялись в повторях)

составило более 50 тысяч ПЦР анализов. Отдельную группу составили 169 пациенток, у которых методом «Nested ПЦР» был определен уровень экспрессии тканеспецифического маркера – маммаглобина в периферической крови.

Дизайн исследования был обусловлен поставленными целью и задачами, включал 3 основных фрагмента (рисунок 1).

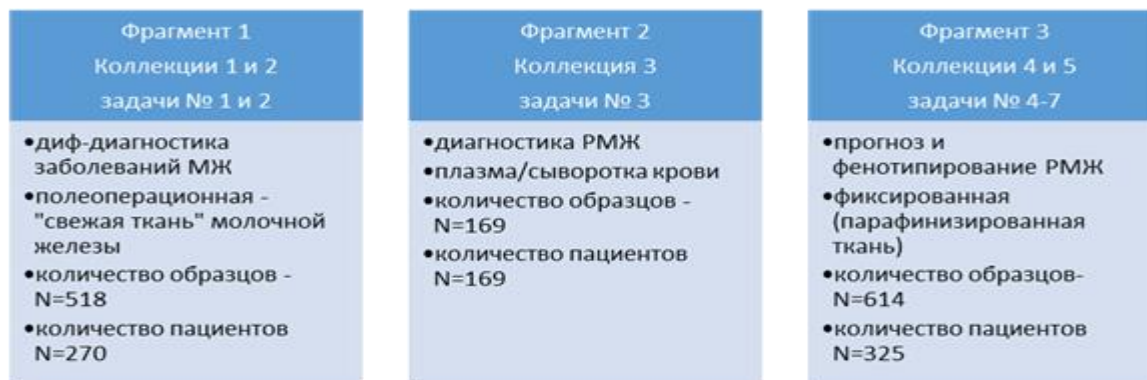


Рисунок 1 — Коллекции образцов, объединенные в зависимости от задач исследования.

Первый фрагмент, был посвящен решению задачи дифференциальной диагностики патологии молочной железы и включал две коллекции образцов.

1-я коллекция – образцы ткани с различной патологией молочной железы (n=209), полученные после операции и поступившие на молекулярно-генетическое исследование без дополнительной обработки (заморозки, фиксации, хранения) – условно названная - «свежая» ткань МЖ.

2-я коллекция – образцы ткани молочной железы после хирургического лечения, помещенные в специализированные пробирки для криохранения в жидком азоте (n=309). Эта группа включала образцы ткани патологического узла и образцы «контроля» в виде образца нормальной ткани молочной железы, взятой на удалении от места забора патологического образца.

В сумме было проанализировано 518 образцов у 270 пациенток, распределение образцов по видам ткани приведено в таблице 1.

Таблица 1 — Распределение образцов нефиксированной послеоперационной ткани суммарно в коллекциях 1 и 2.

Тип ткани/тип патологии	ФА	РМЖ	Всего
Нормальная ткань МЖ	38	209	247
Ткань ФА	54	0	54
Ткань РМЖ	0	216	216
Всего	92	417	518

Второй фрагмент был посвящен решению задачи разработки метода диагностики РМЖ на основании исследования мРНК маммаглобина в периферической крови. Для этого у 169 пациенток было проведено исследование крови методом «нестед-ПЦР» на содержание мРНК маммаглобина. Среди пациентов, у которых была исследована кровь, было 95 пациенток с диагнозом РМЖ, 22 – с доброкачественными заболеваниями молочной железы, 24 – с опухолями других локализаций (среди которых 8- опухоли ЖКТ, 5- рак легкого, 1- рак почки, 2- рак предстательной железы, 12-рак эндометрия) и 24 – практически здоровых добровольца.

Третий фрагмент был посвящен решению задач оптимизации методов определения молекулярного фенотипа РМЖ и разработке методов прогноза рецидивирования после различных видов лечения РМЖ и включал анализ фиксированной и парафинизированной ткани РМЖ. В данный фрагмент вошли 325 пациенток, из которых ретроспективную группу составили 216 пациенток, проспективную – 109. Всего в этой группе было проанализировано 614 образцов ткани, т.к. у большей части пациенток имелось несколько парафинизированных образцов ткани РМЖ, полученных их различных участков опухоли.

Таким образом, в ходе исследования методом количественного ПЦР было проанализировано 518 образцов нефиксированной ткани РМЖ и 614 образцов «парафинизированной» ткани РМЖ.

Морфологическое исследование опухоли включало гистологическое исследование опухоли и блока регионарных лимфоузлов (в случае рака молочной железы). При морфологическом подтверждении диагноза «рак молочной железы» проводилось иммуногистохимическое исследование экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов, прогестерона), эпидермального фактора роста c-erbB2, Ki67, а также исследование амплификации гена c-erbB2 методом FISH (при обнаружении высокого уровня экспрессии методом ИГХ).

Клинико-морфологическая характеристика пациентов. В группу с доброкачественной патологией молочной железы, включено 54 пациентки с диагнозом фиброаденома. Пациентки с диагнозом РМЖ, включенные в исследование, имели распределение по гистологическим диагнозам, представленное в таблице 2. Средний возраст пациенток с РМЖ составил 53,2 лет, средний возраст пациенток с доброкачественной патологией молочной железы составил 37,5 лет и был достоверно меньше, по сравнению с группой РМЖ.

Таблица 2 — Распределение пациенток по гистологическому типу РМЖ (ИПР-инфильтративный протоковый рак, ИДР-инфильтративный дольковый рак).

Гистологический тип РМЖ	n	%
ИПР	393	70,4
ИДР	73	13,0
смешанный	35	6,2
слизистый	35	6,2
прочие	22	3,9
Всего	558	100,0

Пациентки с диагнозом ИДР и ИПР не отличались по безрецидивной выживаемости.

Большую часть пациенток с диагнозом РМЖ составили пациентки стадий T1 и T2 (47,9% и 46,9% соответственно). Пациентки с большими размерами опухоли (T3, T4) или с распространенными формами РМЖ вошли только в проспективную группу, целью исследования которой была сравнительная верификация точности определения молекулярного фенотипа методами ИГХ и РВ-ПЦР. Распределение пациенток с диагнозом РМЖ по размеру опухолевого узла представлено в таблице 3.

Таблица 3 — Распределение пациентов по размеру опухоли (T).

T	n	%
1	285	47,9
2	279	46,9
3	8	1,3
4	23	3,8
Всего	595	100,00

Распределение пациенток, с наличием вовлеченных в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов, показало, что пациентки с N0 составили 372 (61,9%) случая, с N 1 - 158(26,3%), N 2 – 57 (9,48%), N 3 – 14(2,33%) случая.

В большей части образцов ткани рака молочной железы методом ИГХ был определен статус рецепторов эстрогена и прогестерона. Распределение по группам представлено в таблице 4.

Таблица 4 — Распределение пациентов по рецепторному статусу.

ЭР	ПР -	ПР +	Сумма
Отр.	61	46	107
Пол.	45	207	252
Всего	88	213	301

Группы пациенток с диагнозом РМЖ проходили комплексное лечение, включавшее гормональную (ГТ), различные комбинации адъювантной химиотерапии (АПХТ) и были разделены в зависимости от проведенного им лечения для построения прогностических моделей. Пациентки с неоадъювантной химиотерапией не включались в исследование. Варианты соотношения гормонотерапии и химиотерапии приведены таблице 5.

Таблица 5 — Распределение пациенток в зависимости от проведенного им адъювантного лечения (ГТ и/или АПХТ).

АПХТ	ГТ +	ГТ -	Сумма
Да	145	50	195
Нет	65	6	71
Все группы	210	56	266

Методы анализа уровня экспрессии мРНК в образцах. Методика РВ-ПЦР в материале ткани молочной железы состояла из трех этапов: выделение мРНК из образца ткани, проведение обратной транскрипции и собственно ПЦР. Выделение РНК проводили с использованием наборов Qiagen, USA. Обратную транскрипцию и РВ-ПЦР с помощью наборов фирмы ДНК Технология, Россия.

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов (Cp). Следует отметить, что с начала исследований в 2008-2009 году ПЦР наборы претерпели технологические модификации, связанные с необходимостью адаптации наборов для возможности их использования как в «свежей» ткани молочной железы, так и в архивной ткани парафиновых блоков. Это потребовало изменения пар праймеров и длины анализируемых ампликонов для большинства анализируемых генов, кроме того, была увеличена панель генов с 17 до 24 (3 хаускипинга и 21 аналитический ген). В таблице 6 представлены исследованные гены для различных коллекций.

Таблица 6 — Краткая характеристика исследуемых генов, проанализированных в различных коллекциях образцов.

Название гена	Функция	Коллекция 1	Коллекция 3	Коллекции 2,4,5
<i>KI67</i>	Маркер клеточной пролиферации. Экспрессируется в фазы G1, S, G2, M и не экспрессируется в G0	х		х
<i>STK15</i>	Кодирует серин-треонин киназу 6, участвующую в регуляции формирования веретена деления	х		х
<i>CCNB1</i>	Кодирует белок цикла В1 семейства циклинов, контролирующих смену фаз клеточного цикла.	х		х

	Активация комплекса циклин В-Cdk2 необходима для перехода фаз G2/M.			
<i>PTEN</i>	Кодирует белок с фосфотазной активностью, фосфорелирующий молекулярные мишени пролиферативного каскада Akt/PKB.	x		x
<i>CCND1</i>	Кодирует белок циклин D1 семейства циклинов, контролирующих смену фаз клеточного цикла.			x
<i>MYC</i>	Контролирует клеточную пролиферацию, апоптоз.			x
<i>P16INK4a</i>	Ингибитор циклин D зависимых киназ D типа CDK4/6 и останавливает переход клетки в S фазу			x
<i>MYBL2</i>	Ядерный белок, участвующий в поддержании клеточного цикла, фосфорилируется циклин A - зависимой киназой 2, обладает действием как активатора, так и репрессора, активирует гены cdc2, циклина D1			x
<i>BCL2</i>	Кодируемый белок обладает антиапоптотической активностью. Образуя комплекс с белком BAG, блокирует выделение цитохрома C из межмембранного пространства митохондрии.	x		x
<i>BAX</i>	Белок этого гена положительно регулирует высвобождение цитохрома C и по сути является антагонистом BCL2 и BAG	x		
<i>BAG</i>	Коактиватор BCL2, обладающий антиапоптотическими свойствами	x		x
<i>NDRG1</i>	Кодирует белок, необходимый для p53 опосредованной активации каспаз, обладает выраженными проапоптотическими свойствами	x		x
<i>BIRC5</i>	Кодирует белок семейства ингибиторов апоптоза, непосредственно ингибирующий каспазы – мощный ингибитор апоптоза	x		x
<i>TERT</i>	Кодирует обратную транскриптазу теломеразы, фермент, необходимый для репликации концевых (теломерных) фрагментов хромосом. В норме активность фермента низкая	x		x
<i>ESR</i>	Ген кодирует рецептор эстрогена альфа	x		x
<i>PGR</i>	Ген кодирует рецептор прогестерона А	x		x
<i>C-erbB2</i>	Ген кодирует рецептор эпидермального фактора роста	x		x
<i>GRB7</i>	Кодирует белок, моделирующий конформацию рецепторов, в частности семейства эпидермального фактора роста, при связывании с лигандами	x		x
<i>MGB1</i>	Кодирует белок маммаглобин, функции которого неизвестны, однако, его экспрессия повышена в высокодифференцированных опухолях	x	x	x
<i>MMP11</i>	Кодирует матриксную металлопротеиназу, функции которой заключаются в разрушении межклеточного матрикса.	x		x
<i>CTSL2</i>	Кодирует белок катепсин с высокой пептидазной активностью	x		x
<i>CD68</i>	CD68 (кластер дифференцировки 68, макросиалин) — гликопротеин из семейства LAMP	x		x

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Многопараметрические методы анализа включали, дискриминантный, различные варианты кластерного анализа, факторный анализ и метод главных компонент. Для сопоставления групп по количественным признакам использованы статистики: U-критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона и t-тест Стьюдента, а также метод дисперсионного анализа ANOVA. Различие групп полагали статистически значимым при $P < 0,05$. Обработку полученных результатов проводили в программном пакете StatSoft Statistica 10.

Результаты собственных исследований.

Анализ уровня экспрессии генов в зависимости от типа ткани.

Сравнение морфологически неизменной ткани молочной железы (НТ) и ткани рака молочной железы (РМЖ). В Коллекции №1 была проанализирована экспрессия 17 генов в 208 образцах ткани молочной железы. Сравнивались уровни экспрессии генов в тканях: РМЖ, фибroadеномы и неизменной ткани молочной железы. В исследование были включены образцы ткани рака молочной железы ($n=69$), образцы фибroadеномы молочной железы ($n=41$) и образцы неизменной ткани молочной железы ($n=98$). Распределение образцов по типу ткани приведено в таблице 7.

Таблица 7 — Распределение взятых в исследование образцов по типу ткани.

Тип ткани/количество образцов	ФА	РМЖ	Всего
Норма	30	68	98
ФА	41	0	41
РМЖ	0	69	69
Всего	71	137	208

Результаты сравнительного анализа экспрессии исследованных генов в группах РМЖ-ФА-нормальная ткань молочной железы приведены в таблице 8. Полученные результаты показывают, что в тканях РМЖ и ФА достоверно отличаются уровни экспрессии таких генов, как Ki-67, STK15, Birc5, CCNB1, MMP11, HER2 neu, BCL2, NDRG, PTEN. При сравнении групп: рак молочной железы – неизменная ткань МЖ получены достоверные отличия в уровне экспрессии мРНК генов: Ki-67, STK15, Birc5, CCNB1, MMP1, GRB7, BCL2, NDRG, ESR, PTEN. Для групп «ФА – неизменная ткань МЖ» достоверные отличия обнаружены только для уровня

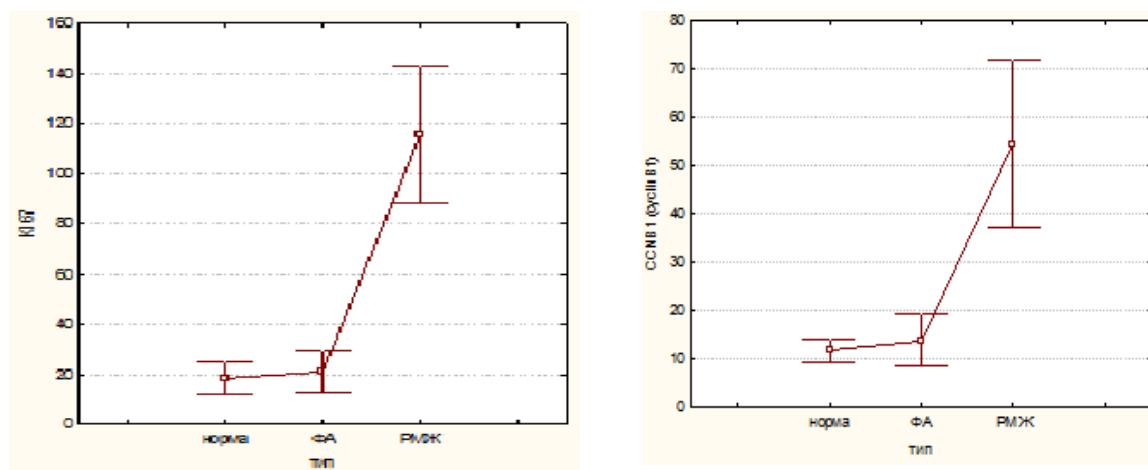
экспрессии мРНК гена MMP11. В группе «неизменная ткань МЖ» у больных с фиброаденомой и «неизменная ткань МЖ» для больных раком молочной железы уровни экспрессии достоверно отличаются для двух генов: MMP11, PRG.

Таблица 8 — Достоверность отличия экспрессии генов, критерий Краскелла-Уоллиса.

Показатель\ Группы	PMЖ-ФА	PMЖ-Норма (PMЖ)	ФА-норма (ФА)	Норма (ФА) - Норма (PMЖ)
Ki-67	0.0001*	0,0000*	0,3272	0,2006
STK15	0.0018*	0,0000*	0,1416	0,7156
Birc5	0.0001*	0,0000*	0,1025	0,1558
CCNB1	0.0006*	0,0000*	0,5676	0,4217
MMP11	0.0003*	0,0000*	0,0044*	0,0210*
CTSL2	0.1258	0,1492	0,5136	0,2583
HER2 neu	0.0176*	0,4392	0,7903	0,0531
GRB7	0.6470	0,0004*	0,7324	0,0945
BCL2	0.0215*	0,0001*	0,7903	0,9033
BAG	0.0848	0,2931	0,6761	0,3359
BAX	0.2116	0,0180*	0,4624	0,3849
NDRG	0.0111*	0,0000*	0,3051	0,6337
ESR	0.8881	0,0098*	0,1208	0,6606
PRG	0.0942	0,2523	0,4704	0,0466*
PTEN	0.0128*	0,0002*	0,8494	0,9330
MGB1	0.3383	0,0116*	0,092*	0,3423
TERT	0.0651	0,0667	0,1213	0,1131

* - достоверность отличий $p < 0.05$

На рисунке 2 представлены различия уровней Ki-67 и CCNB1 в ткани PMЖ, ФА и неизменной ткани МЖ.



А

Б

Рисунок 2 — Средние значения и стандартная ошибка уровня экспрессии мРНК гена Ki67 (А) и циклина В (CCNB1) (Б) в нормальной ткани молочной железы, ткани фиброаденомы и PMЖ.

Подобный вид имеют и зависимости экспрессии для генов STK15, BIRC5, MMP11, MGB1 – т.е. генов, контролирующих пролиферацию и дифференцировку, а именно – резкое увеличение уровня их экспрессии при РМЖ. Результат проведенного исследования уровней экспрессии генов показал, что для генов BCL2 и NDRG1 в ряду нормальная ткань - фиброаденома – РМЖ наблюдается уменьшение экспрессии генов с достоверными отличиями между группами ФА-РМЖ (рисунок 3).

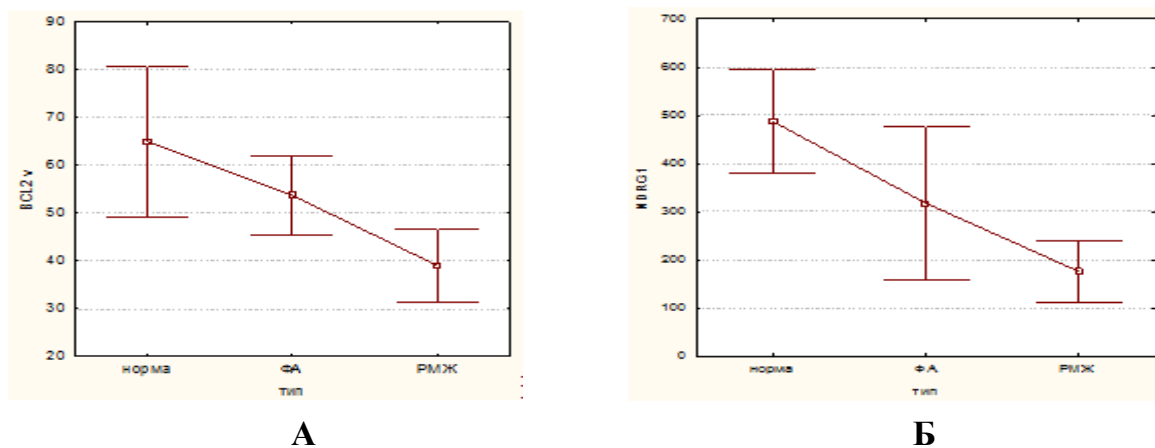


Рисунок 3 — Средние значения и стандартная ошибка уровня экспрессии мРНК генов BCL2 (А) и NDRG1 (Б) в нормальной ткани молочной железы, фиброаденомы и РМЖ.

Для генов, контролирующих апоптоз, обнаружен принципиально другой характер зависимости – уровень их экспрессии снижается при ФА и еще более при РМЖ. Обнаруженные закономерности были положены в основу формирования панели биомаркеров для дифференциальной диагностики патологии молочной железы.

Определение оптимальной панели биомаркеров для диагностики и прогноза заболеваний молочной железы. Алгоритм применения полученной панели генов при обследовании пациенток с патологией молочной железы. Полученные достоверные данные изменений в уровнях экспрессии генов Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP11, MGB1 при различной патологии молочной железы, позволяют использовать эти отличия для дифференциальной диагностики РМЖ и ФА. Эти же гены можно использовать для исключения/подтверждения диагноза РМЖ (уровень экспрессии этих генов в ткани РМЖ достоверно отличается от уровня экспрессии в неизменной ткани и ткани ФА). В качестве количественной меры для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных процессов в молочной железе можно рекомендовать использовать уровень двукратного превышения экспрессии генов Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP11, MGB1 относительно средних значений, полученных для

группы ФА. Дополнительными критериями могут быть изменения (снижение) уровней экспрессии генов BCL2 и NDRG1.

Анализ полученных результатов позволил сформулировать простое правило: для ткани РМЖ характерно повышение экспрессии как минимум 1 из генов из списка Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1(маммаглобин). Это правило позволяет достоверно поставить диагноз для 79% случаев не верифицируемых клинкорadiологическими методами. Включение обнаруженных нами молекулярно-биологических маркеров в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики с 81 до 96%.

Анализ уровня экспрессии генов в зависимости от клинко-морфологических характеристик опухоли рака молочной железы. Проведен анализ зависимости уровня экспрессии комплекса исследованных генов от морфологических особенностей опухоли: размеров, наличия метастазов, степени злокачественности и других, клинически важных характеристик (таблицы 9-14).

Таблица 9 — Сравнение средних значений уровня экспрессии генов в образцах РМЖ в зависимости от размеров опухоли.

Наименование гена/значение	Среднее для T1	Среднее для T2	p
STK15	105,0	325,63	0,00897*
BIRC5	59,5	136,45	0,00738*
CCNB1	29,3	71,27	0,02561*
BCL2	47,8	29,53	0,04139*
PTEN	8,1	6,08	0,04463*

* отличия высоко достоверны.

Анализ результатов, приведенных в таблице показывает, что увеличение размеров опухоли сопровождается статистически значимым повышением экспрессии генов STK15 и CCNB1, генов, контролирующих пролиферацию и снижением экспрессии гена-опухолевого супрессора PTEN. В группе генов контролирующих апоптоз отмечается повышение экспрессии BIRC5 и снижение экспрессии BCL2. Продуктами этих генов являются белки, выполняющие антиапоптотические функции и их разнонаправленные изменения могут указывать на нарушение контроля апоптоза в процессе опухолевой прогрессии. Сравнение зависимости уровня экспрессии комплекса генов от степени лимфогенного метастазирования показало, что группы N0 и N1 не имеют достоверных отличий по анализируемым генам. Достоверные отличия зарегистрированы при сравнении групп N0 и N2. При этом отличаются экспрессии генов CCNB1, BAX, BIRC5, CTSL2, MMP11, Her2/neu (таблица 10).

Таблица 10 — Отличия экспрессии генов в образцах РМЖ в зависимости от наличия/отсутствия лимфогенных метастазов

Наименование гена/значение	Среднее для N0	Среднее для N2	p
BIRC5	85,1	246,41	0,02029*
CCNB1	43,4	96,01	0,05064*
MMP11	169,9	440,78	0,08881
CTSL2	23,9	137,06	0,04197*
HER-2/neu	37,7	109,09	0,07952
BAX	21,1	31,99	0,04313*

В образцах N2 повышена экспрессия маркера пролиферации CCNB1, ингибитора каспаз BIRC5, проапоптотического гена Вах, рецептора эпидермального фактора роста

C-erbB2, а также протеолитических ферментов MMP11 и CTSL2 по сравнению с N0. Сравнение этих отличий с отличиями в экспрессии генов при увеличении размеров опухоли от T1 к T2 показывает схожие закономерности изменений – увеличение уровня экспрессии комплекса генов- контролирующих пролиферацию: BIRC5, CCNB1, Her-2/neu, нарушение контроля апоптоза – снижение экспрессии проапоптотического белка Вах. Однако имеются существенные отличия, отражающие, по-видимому, важный патогенетический механизм увеличения метастатического потенциала опухоли – резкое увеличение экспрессии тканевых протеаз – MMP11 и CTSL2, которые позволяют опухолевой клетке разрушать тканевую, соединительно-тканый матрикс и увеличивать мобильность клеточных элементов. Для всех образцов иммуногистохимическим методом был определен рецепторный статус опухоли: ЭР, ПР, Her2/neu. Результаты анализа экспрессии генов в зависимости от рецепторного статуса, регистрируемого методом ИГХ, представлены в таблицах 11-14.

Таблица 11 — Сравнение средних значений уровней экспрессии генов в группах ЭР - и ЭР + в ткани РМЖ.

Наименование гена/значение	ЭР -	ЭР +	p
BIRC5	167,7	88,1	0,07
CTSL2	78,5	17,9	0,07
GRB7	3944,4	1015,3	0,05*
BCL2	28,2	44,4	0,04*
BAG	3,6	5,8	0,10
NDRG1	260,5	132,9	0,05*
ESR	141,6	492,2	0,00
PRG	1819,2	5452,2	0,04*

Анализ полученных результатов показывает, что опухоли не экспрессирующие ЭР имеют достоверно более высокие уровни экспрессий генов GRB7 и NDRG1, тенденцию к увеличению генов BIRC5 и CTSL2 и достоверное снижение уровня экспрессии гена BCL2. Результаты аналогичного анализа для опухолей РП+ и РП- групп представлены в таблице 12.

Таблица 12 — Отличия средних значений уровней экспрессии генов в группах ПГ+ и ПГ- в ткани РМЖ .

Наименование гена/значение	ПГ+	ПГ-	P
STK15	182,67	311,6	0,09
CTSL2 (cathepsin L2)	17,98	72,5	0,09
CerbB2 (HER-2/new)	19,76	81,4	0,01*
GRB7	593,66	4388,2	0,01*
BAX	21,58	28,5	0,06
NDRG1	151,59	216,3	0,32
ESR	521,62	124,6	0,00
PRG	6167,41	939,1	0,00
TERT	14,56	67,5	0,01*

Значимые отличия экспрессии генов между ПГ+ и ПГ- получены для генов GRB7, C-erbB2 и TERT. Опухоли с ПГ- статусом имеют достоверное увеличение экспрессии данных генов и тенденции к увеличению экспрессии генов STK15, CTSL2, BAX.

Сравнение уровней экспрессии генов в ткани РМЖ в группах с наличием или отсутствием амплификации гена Her2/neu показал, что они существенно отличаются по активности ряда генов (таблица 13). Следует отметить важный момент, что группы с наличием или отсутствием амплификации данного гена не отличаются по активности пролиферации, определяемой на основании экспрессии гена Ki67 – стандартного маркера активности пролиферации.

Таблица 13 — Сравнение уровней экспрессии генов в группах с наличием и отсутствием амплификации гена Her2/neu (метод FISH).

Наименование гена/значение	Среднее для Her2/neu -	Среднее для Her2/neu +	t-value	p
KI 67	112,02	107,0	0,14207	0,887975
STK15	178,06	371,3	-1,69602	0,100237
BIRC5	83,31	165,6	-2,01541	0,053213*
CTSL2	16,08	37,1	-2,32125	0,027254*
HER-2/new	28,10	58,4	-1,21596	0,233483
GRB7	813,60	4212,6	-2,30685	0,028147*
ESR	409,56	132,7	1,84634	0,074730
PRG	4088,01	581,2	2,06461	0,047698*
MGB1	50448,61	164622,8	-1,69258	0,100898

Следует также отметить такой факт как низкий уровень экспрессии генов рецепторов эстрогенов и прогестерона (ESR, PGR) в группе с амплификацией HER2/neu. Сопоставление этих данных с результатами достоверно более высокой экспрессии генов BIRC5 и STK15 (отражающих активность процесса пролиферации) позволяет высказать предположение, что амплификация Her2/neu - компенсаторный механизм, направленный на сохранение высокого пролиферативного уровня в опухолях, с потерей гормональной зависимости пролиферации. Эти результаты согласуются с данными, указывающими на то, что Her2- позитивные опухоли имеют отличную от ER + позитивных опухолей клиническую картину и для них должны использоваться другие схемы лечения.

При сравнительном анализе экспрессии генов в зависимости от степени злокачественности, определяемой морфологическим методом, было обнаружено, что в образцах G3 повышена экспрессия генов маркеров пролиферации STK15 и CCNB1, а также экспрессия катепсина CTSL2. Экспрессия C-erbB2 и его гомолога GRB7 также была повышена в этой группе, а экспрессия ESR, PGR, и маммаглобина MGB1 была ниже в группе с более высокой степенью злокачественности (таблица 14). Полученные результаты соответствуют представлениям о снижении степени дифференцировки и увеличении пролиферативного пула при прогрессии опухоли.

Таблица 14 — Отличия экспрессии генов в образцах ткани РМЖ в зависимости от степени злокачественности опухоли G.

Ген	n G1	n G3	Среднее G1	Среднее G3	p
STK15	23	9	150,9	371,50	0,056505
CCNB1	23	9	34,6	55,51	0,062933
PRG	23	9	4347,9	951,11	0,068085
ESR	23	9	393,47	117,6	0,063471
C-erbB2	23	9	17,7	84,25	0,004652*
GRB7	23	9	577,8	4837,16	0,041629*
MGB1	23	9	187572,2	17533,47	0,013123*
CTSL2	23	9	16,0	37,13	0,020145*

Для проверки надежности полученных данных анализа экспрессионного профиля в послеоперационной ткани РМЖ и обоснования возможности использования полученных результатов для проведения анализа архивных образцов из криохранилища, было выполнено сравнение уровней экспрессии для групп образцов у которых выделение РНК производилось из свежей ткани и образцов, подвергшихся криозаморозке и хранению в течение от 1 года до 4 лет. В ходе проведенного сравнения полученных закономерностей было показано, что более

80% зависимостей, обнаруженных для образцов ткани выделенной непосредственно после хирургического вмешательства, воспроизводятся при анализе архивной криоколлекции. Эти результаты позволили сделать вывод, что обнаруженные зависимости изменения экспрессии генов, а также разработанные на основании этих зависимостей диагностические алгоритмы, обладают высокой степенью надежности и могут быть использованы для анализа как «свежих», так и архивных образцов.

Исследование экспрессии мРНК маммаглобина в крови.

Возможность диагностики злокачественной опухоли на ранней стадии заболевания принципиально важна для более благоприятного исхода ее лечения. Одним из подходов для решения данной задачи является изучение специфических молекулярных маркеров в периферической крови пациентов. В проведенных ранее исследованиях было показано, что уровень маммаглобина в ткани РМЖ повышается именно при начальных стадиях, что позволяет надеяться на возможность использования анализа мРНК маммаглобина в периферической крови в качестве диагностического маркера РМЖ. В работе было проведено исследование анализа мРНК маммаглобина в крови здоровых доноров, при раке молочной железы, при доброкачественной патологии молочной железы, а также в крови пациентов имеющих злокачественные опухоли другой локализации. В таблице 15 приведены результаты по выявлению маммаглобина в периферической крови у пациентов с различными диагнозами.

Таблица 15 - Частота обнаружения мРНК маммаглобина методом «Nested» ПЦР в плазме крови у различных групп пациентов.

		Количество наблюдений	Положительный результат	Процент, положительных случаев.
РМЖ		95	58	61%
Доброкачественные образования молочной железы	Фиброзно-кистозная мастопатия	4	1	25%
	Фиброаденома	16	4	25%
	Фибросклероз	2	0	0
Опухоль другой локализации	Опухоли ЖКТ	8	0	0
	Опухоли органов дыхания	5	1	20%
	Рак почки	1	0	0
	Рак предстательной железы	2	0	0
	Рак матки, эндометрия	12	0	0
Здоровые доноры		24	0	0

В отличие от образцов ткани молочной железы, исследование мРНК маммаглобина в плазме крови осуществлялось методом «nested» ПЦР, что было обусловлено низким содержанием мРНК маммаглобина в плазме крови. Данный метод не является количественным, т.е. можно было определить наличие или отсутствие экспрессии мРНК маммаглобина в том или ином образце по принципу «да»-«нет». Проведенные исследования по обнаружению мРНК маммаглобина в периферической крови показали, что в группе больных РМЖ мРНК маммаглобина обнаруживается в 61 % всех исследованных случаев. У пациенток с доброкачественными образованиями молочной железы экспрессия мРНК маммаглобина была обнаружена в 22,7% случаев. В образцах крови пациентов с другой локализацией опухолевого процесса мРНК маммаглобина была обнаружена лишь в одном случае, у пациентки больной раком легкого. Среди образцов крови здоровых доноров мРНК маммаглобина не обнаружена. Таким образом, мРНК маммаглобина обнаруживается преимущественно при патологии молочной железы и не обнаруживается при других злокачественных новообразованиях. Результаты исследования частоты обнаружения мРНК маммаглобина в крови в зависимости от размера опухоли молочной железы (Т по классификации TNM) представлены на рисунке 4.

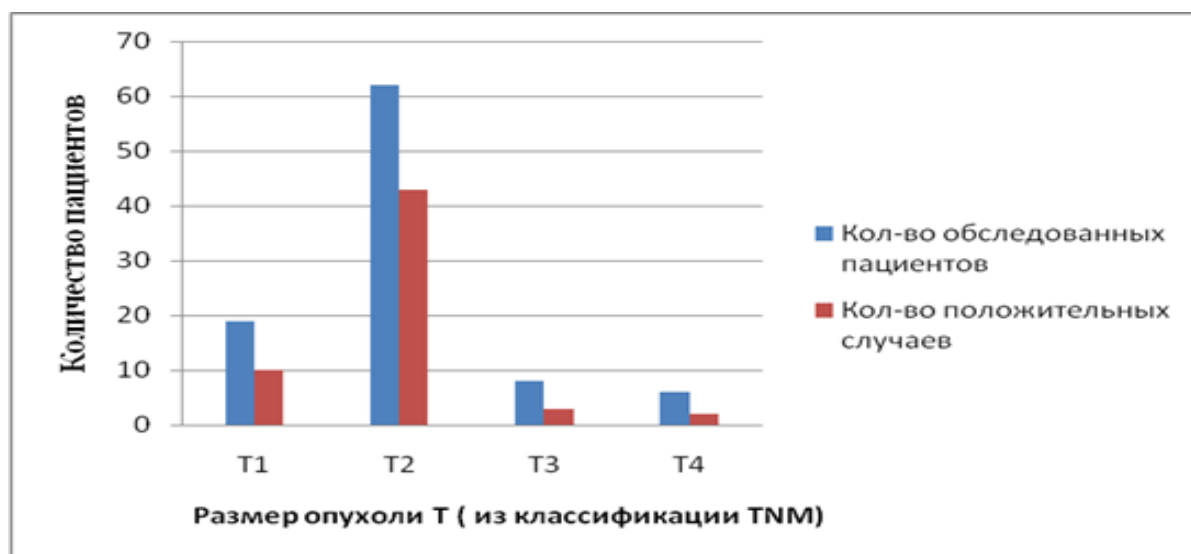


Рисунок 4 - Распределение пациенток по размеру опухоли Т (по классификации TNM) и количество пациенток с наличием мРНК маммаглобина в крови.

Полученные результаты позволяют определить чувствительность и специфичность метода обнаружения мРНК маммаглобина в периферической крови для диагностики РМЖ. Чувствительность метода составила 61%, а специфичность – 92%.

Сравнительная оценка моделей определения фенотипа опухоли с использованием расширенной панели экспрессии генов и панели классических маркеров при раке молочной железы.

Определение фенотипа рака молочной железы (РМЖ) имеет большое клиническое значение. В тоже время, использование для этой цели «суррогатного» ИГХ метода 4-х маркеров (KI67, PЭ, РП, HER2/neu), не является достаточным для прецизионного фенотипирования опухоли (Guiu1,S., 2012, Park S., 2011). Расширение и оптимизация панели маркеров для получения большей клинической значимости результатов является актуальной задачей современной молекулярной диагностики.

В проведенном исследовании была выполнена сравнительная оценка моделей определения фенотипа опухоли методом ПЦР в реальном времени с использованием расширенной панели из 24 генов в 359 образцах парафинизированной ткани РМЖ. Для 216 больных РМЖ I-II стадии была получены данные о 10-летней безрецидивной выживаемости и выполнена сравнительная ее оценка в фенотипических группах.

Одной из целей исследования было определить, насколько выбранные нами гены отражают известные феноменологические особенности фенотипов РМЖ. Другой целью было выяснить, какую дополнительную информацию об индивидуальном фенотипе может дать использование сформированной нами панели маркеров (21 ген) по сравнению с классическими маркерами: KI67, рецепторами эстрогена/прогестерона, HER2/neu, анализируемыми методом ИГХ.

Была проанализирована возможность классификации на основании метода К-средних на 5 групп. Количество групп выбрано на основании принятого, в настоящее время, количества молекулярных фенотипов РМЖ. Значения средних для экспрессии генов сохранили в виде новой независимой переменной, которую впоследствии использовали как идентификатор класса фенотипа для сравнения его с фенотипом, полученным с помощью метода ИГХ или других методов классификации. Для полученных кластеров вычислили средние значения уровней экспрессии проанализированных генов. Также была проведена проверка классификации на обнаруженные 5 кластеров с помощью метода дискриминантных функций. Результат совпадения классификации на основании метода К-средних и метода дискриминантных функций показал совпадение для более 94% образцов, что говорит о высокой достоверности существования полученной дискриминации образцов опухоли на группы, с различными особенностями экспрессии генов (различными молекулярными фенотипами). На рисунке 5 показано распределение образцов опухоли по группам (приведены значения канонических функций).

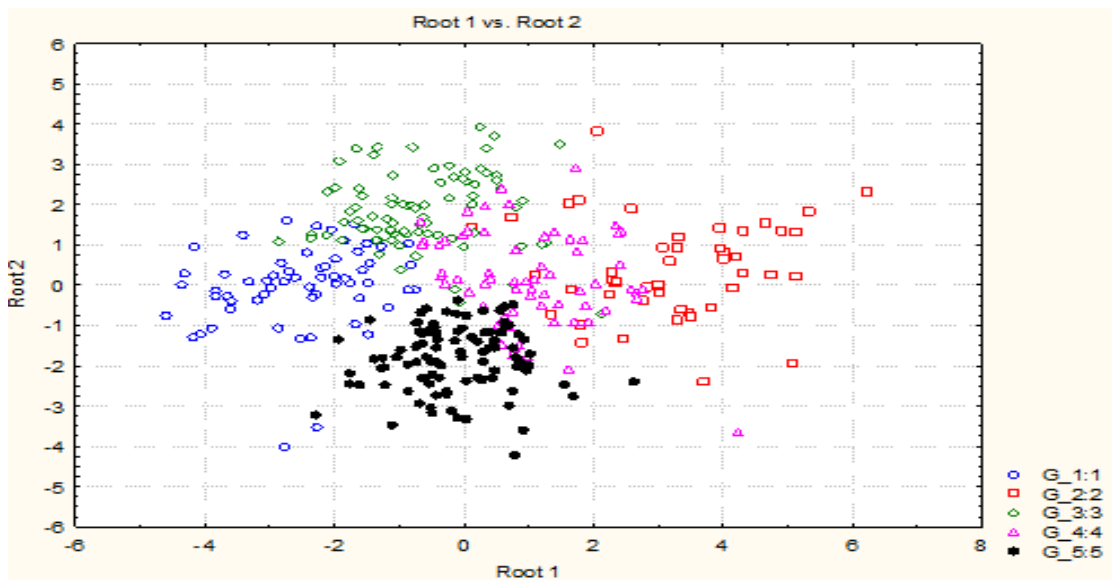


Рисунок 5 — График двух канонических функций для полученных 5 фенотипов РМЖ.

Также был проведен анализ группировки образцов с помощью других алгоритмов кластерного анализа (кластерный анализ по методу Варда с оценкой евклидова расстояния между исследуемыми объектами (образцами)), различные варианты метода деревьев классификации. Все методы успешно выявляли идентичные 5 классов (фенотипов), которые были обозначены, соответственно, А, В, С, D и Е. Вариант решения с применением метода деревьев классификации показан на рисунке 6.

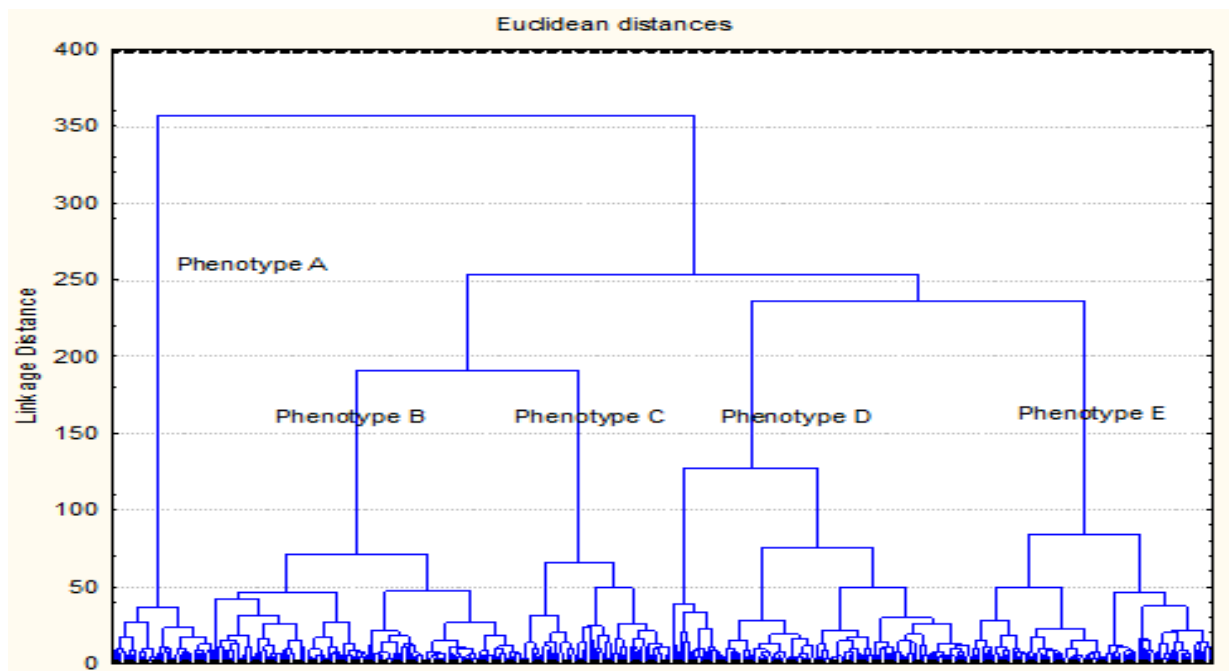


Рисунок 6 - Дерево кластеризации исследуемых образцов ткани (n=359) по методу Варда с определением евклидова расстояния между объектами (образцами).

На рисунке 6 в фенотип А было включено 32 из 359 образцов (8,9%), в фенотип В - 111 образцов (30,9%), в фенотип С - 70 образцов (19,5%), в фенотип D - 106 образцов (29,5%) и в фенотип Е - 40 образцов (11,2%).

Совпадение результатов кластерного анализа, деревьев классификации и линейного дискриминантного анализа, а также логика включения генов в дискриминирующую модель свидетельствуют о существовании значительных фенотипических отличий в исследуемых образцах, а также о способности выбранных генов описывать эти отличия на уровне статистической значимости. Нам было важно оценить, насколько закономерности экспрессии комплекса генов, в выявленных группах (фенотипах), соответствуют существующим в литературе представлениям о молекулярных фенотипах рака молочной железы.

Оценка уровня экспрессии мРНК «классических» маркеров фенотипирования в выявленных группах. Иммуногистохимическая оценка классических маркеров фенотипирования (KI67, рецепторов эстрогена, прогестерона и HER2/neu) описывает 5 различных фенотипов для гетерогенной группы РМЖ: тройной-негативный, люминальный А, В (HER2/neu-позитивный фенотип и негативный) и HER2/neu-позитивный фенотип. Нами также был проведен анализ закономерностей отличий уровней экспрессии мРНК генов, кодирующих эти маркеры, в полученных, на основании кластеризации по результатам анализа комплекса из 21 гена, фенотипических группах. Характерные закономерности представлены на рисунках 7-9.

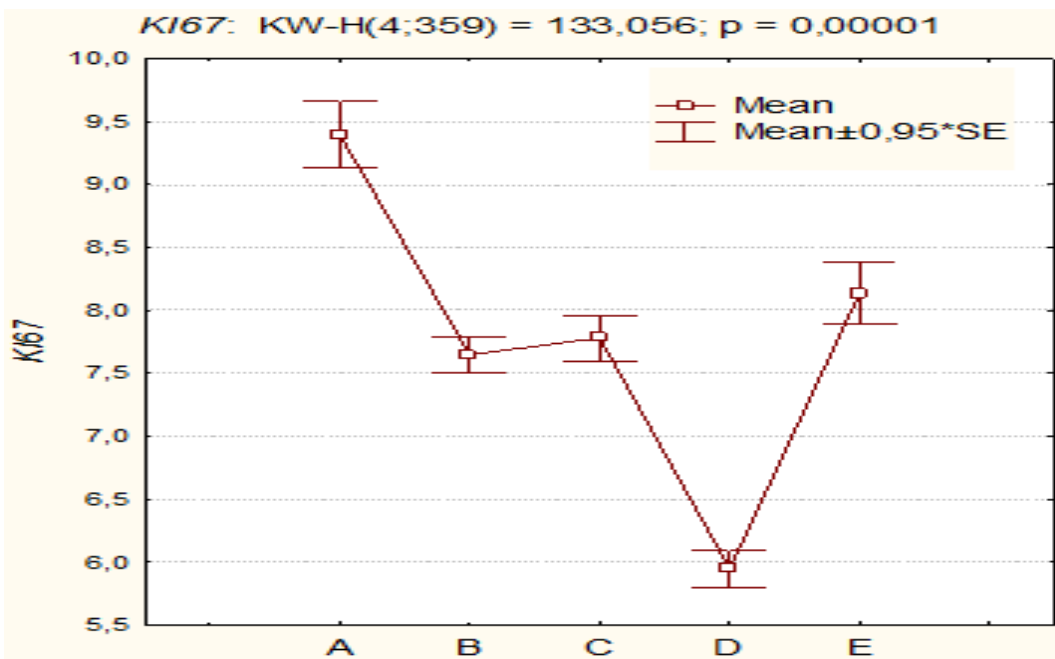


Рисунок 7 - Отличие уровня экспрессии KI67 в группах, сформированных на основании кластерного анализа профиля экспрессии генов.

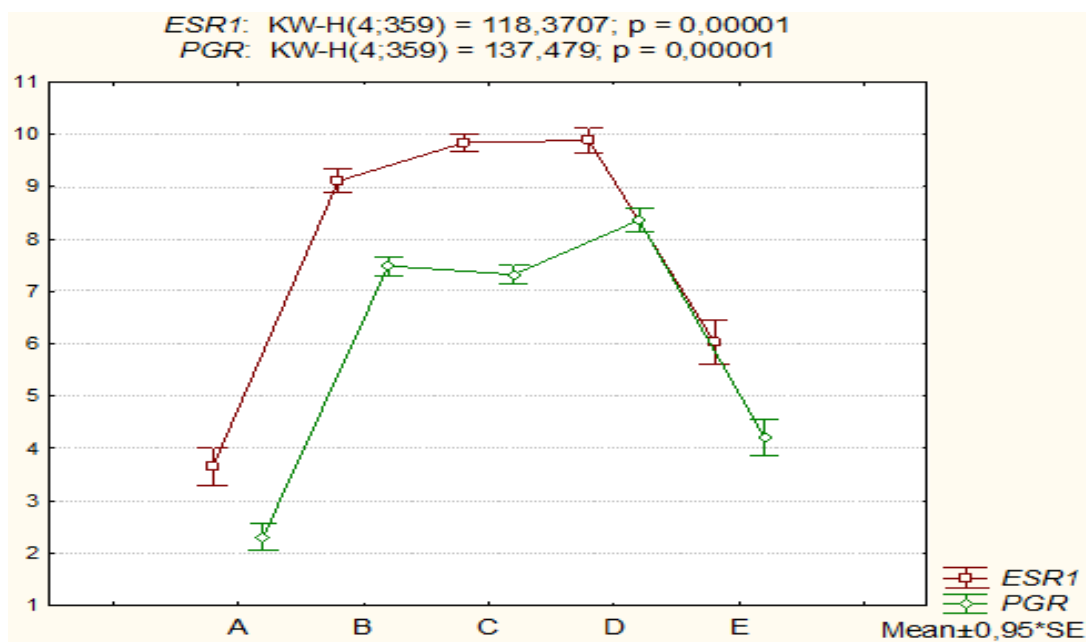


Рисунок 8 — Отличие уровней экспрессии генов ESR1 и PGR в группах, сформированных на основании кластерного анализа профиля экспрессии генов.

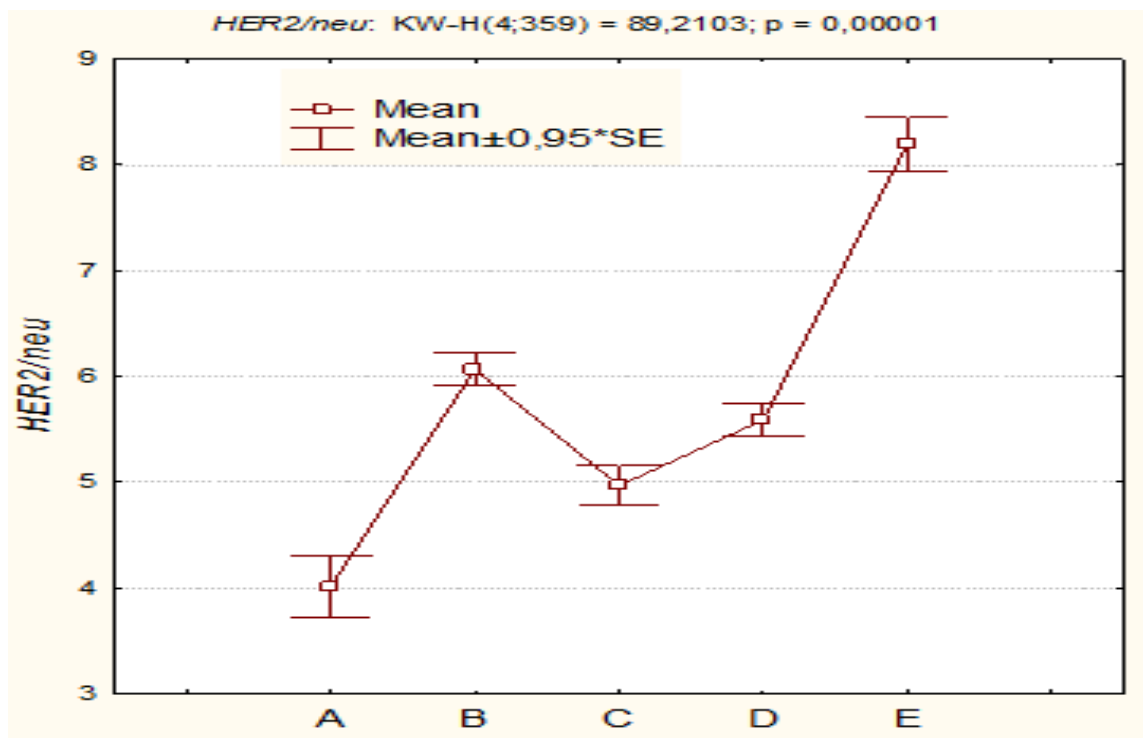


Рисунок 9 — Отличие уровней экспрессии HER2/neu в группах, сформированных на основании кластерного анализа профиля экспрессии генов.

Полученные результаты показывают, что для фенотипа А характерен максимальный уровень экспрессии *KI67*, отражающий высокую пролиферативную

активность, при минимальной экспрессии рецепторов стероидных гормонов и *HER2/neu*. Фенотипы В, С и D характеризовались наиболее высокой экспрессией *ESR1* и *PGR* при низком, а для фенотипа D отмечен минимальный уровень пролиферативной активности (низкая экспрессия *KI67*). Среди рецептор-позитивных фенотипов с высокой пролиферативной активностью (В и С) для фенотипа В отмечена более высокая экспрессия *HER2/neu*. Для фенотипа Е была получена умеренная пролиферативная активность и максимальный среди всех наблюдаемых групп уровень экспрессии *HER2/neu*. Полученные результаты по закономерности распределения средних уровней экспрессии 4 генов в выявленных группах позволили сопоставить выявленные «слепыми» статистическими методами классификации фенотипы с существующей стратификацией молекулярных фенотипов РМЖ на основе классических ИГХ маркеров фенотипирования. В таблице 16 соотнесены выявленные в исследовании и классические фенотипы, предложенные на St. Gallen International Expert Consensus.

Таблица 16 - Сопоставление сформированных на основании кластерного анализа профиля экспрессии генов фенотипов с «классическими».

Классический фенотип	Базальный	Люминальный В <i>HER2/neu</i> - позитивный	Люминальный В <i>HER2/neu</i> - негативный	Люминальный А	Her2- позитивный
Выявленный фенотип	А	В	С	Д	Е

Таким образом, уровни экспрессии генов, кодирующих классические маркеры фенотипирования РМЖ в полученных нами классах-кластерах, характеризуются закономерными межфенотипическими отличиями, и соответствуют классическим представлениям о молекулярной феноменологии РМЖ.

Далее проведена оценка безрецидивной выживаемости больных в выявленных фенотипических группах. Анализ выживаемости по методу Каплана-Майера продемонстрировал наличие высокой достоверности отличий для выявленных фенотипов ($p=0,00003$) (рисунок 10).

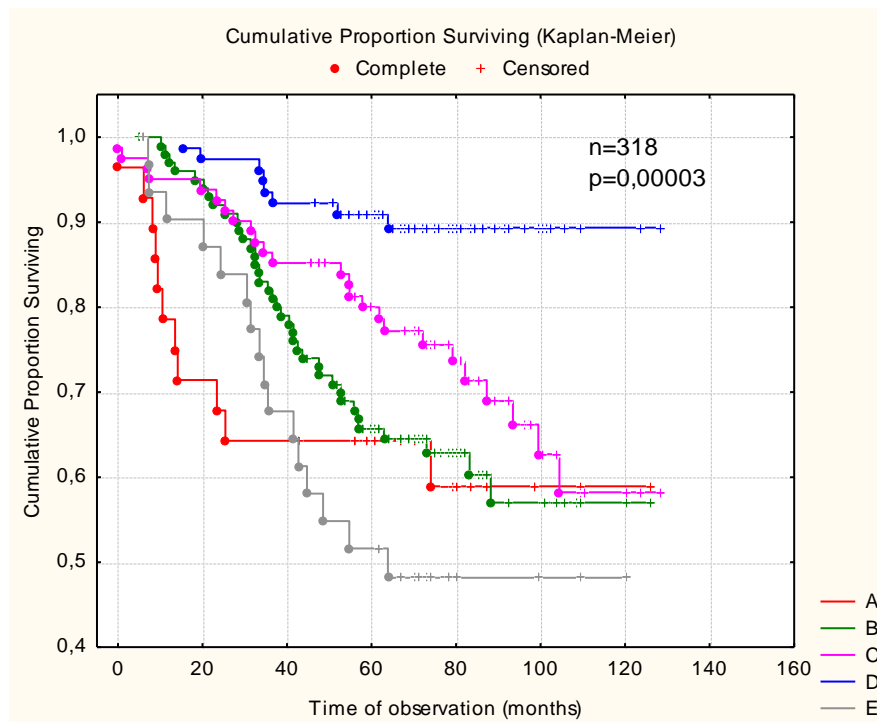


Рисунок 10 – Анализ безрецидивной выживаемости больных в зависимости от выявленного фенотипа согласно анализа профиля экспрессии генов методом РВ-ПЦР.

Результаты анализа выживаемости демонстрируют корреляцию фенотипических свойств опухоли и безрецидивной выживаемости больных. В частности, это справедливо для рецептор-позитивных фенотипов, где у пациентов с наименее агрессивным фенотипом D отмечена максимальная частота десятилетней безрецидивной выживаемости, значения которой были выше по сравнению с фенотипами B и C, характеризующимися более высокой пролиферативной и антиапоптотической активностью. Таким образом, анализ фенотипа на основе многопараметрической оценки молекулярных маркеров методом РВ-ПЦР, демонстрирует связь этих процессов с риском прогрессирования заболевания.

Т.к. в используемой в настоящее время «суррогатной» модели определения молекулярного фенотипа РМЖ применяется определение только 4-х маркеров методом ИГХ нами проведено сравнение классификации на молекулярные фенотипы на основании 4 генов, включенных в «суррогатную» панель, и классификации, полученной на основании всего комплекса проанализированных генов. Такое сравнение представлено в таблице 17.

Таблица 17 — Анализ соответствия попадания в фенотипические группы на основании 4-х генной и расширенной (21) панели (строки в таблице обозначают наблюдаемое количество образцов в группах; столбцы – прогнозируемое количество).

Фенотип	Вероятность совпадения (%)	A	B	C	D	E
A	87,50000	28	0	1	0	3
B	55,85585	2	62	10	25	12
C	41,42857	0	30	29	11	0
D	66,98113	2	25	7	71	1
E	67,50000	6	6	0	1	27
Общая точность классификации (%)	60,44568	38	123	47	108	43

Полученный результат, показывает расхождение классификации для большинства групп, что может свидетельствовать о том, что хотя классические маркеры и отражают закономерности отличий различных фенотипов, они являются явно недостаточными для прецизионной оценки индивидуального фенотипа опухоли. В случае редукции модели фенотипирования до четырех ключевых маркеров анализ межиндивидуальной вариабельности для многих образцов становится невозможным. Это косвенно подтверждается результатами анализа выживаемости в фенотипических группах, полученных на основании анализа только 4 «классических» маркеров (рисунок 11).

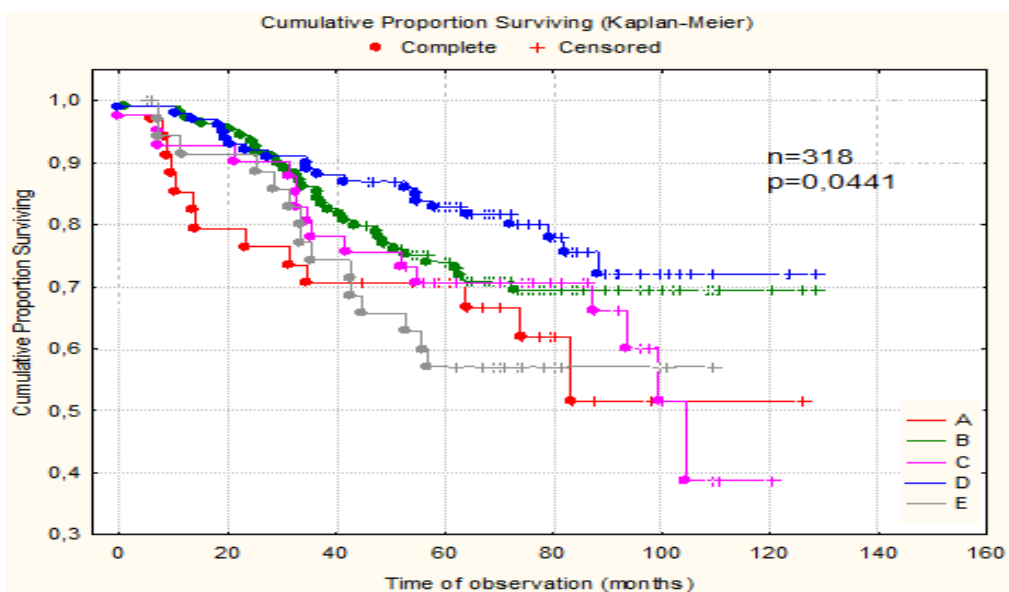


Рисунок 11 - Анализ безрецидивной выживаемости больных в зависимости от выявленного фенотипа на основании анализа уровня экспрессии 4 генов.

Очевидно, что снижение достоверности отличия выживаемости в фенотипических группах, полученных только на основании анализа 4 маркеров, говорит о более низкой ее диагностической значимости. Клиническую значимость ошибок классификации, получаемой при использовании только 4 маркеров можно продемонстрировать при сравнении количества рецидивов в группах с ошибочной оценкой фенотипов (таблица 18).

Таблица 18 - Ошибка классификации фенотипов люминальных А и В при использовании 4-х генной модели, а также количество прогрессирований у неверно классифицированных пациентов.

Фенотип (расширенная модель)	Кол-во неверно классифицированных по редуцированной модели (%)	Направление ошибки классификации	Кол-во прогрессирования/ Кол-во неверно классифицированных (%)
Люм.В Her2+	25 из 111 (22,5%)	Люм.В Her2+→ Люм.А	14 из 36 (36,5%)
Люм.В Her2-	11 из 70 (15,7%)	Люм.В Her2-→ Люм.А	
Люм.А	32 из 106 (33,9%)	Люм.А→Люм.В	3 из 32 (9,3%)

Проведенный анализ показывает, что 32 больных РМЖ с Люминальным А фенотипом (33,9%) могли бы получить (получили) излишне агрессивную терапию, тогда как риск прогрессирования как минимум 37 больных с Люминальными В фенотипами по-видимому был недооценен, что отражается высоким уровнем рецидивирования в этой группе. Таким образом, проведенные исследования уровня экспрессии 21 гена в ткани РМЖ и использованные варианты классификации, позволили разработать метод определения молекулярных фенотипов опухоли соответствующих соглашению St. Gallen International Expert Consensus и, в тоже время, обладающий большей клинической значимостью, чем «суррогатный» традиционный подход на основании ИГХ метода.

Перспективный анализ эффективности определения молекулярного фенотипа РМЖ. В работе проведен проспективный сравнительный анализ эффективности определения фенотипа молекулярно-генетическим методом и методом ИГХ. В качестве образцов для этого исследования были использованы парафиновые блоки опухолей, полученные после хирургического этапа лечения у пациенток в период январь-март 2016 г. В процессе обработки парафиновых блоков (получения срезов для ИГХ) делались 2 дополнительных 10 мкм среза для молекулярно-генетического анализа. Результаты по анализу экспрессии генов в образцах использовались для определения молекулярного фенотипа опухоли на основании

алгоритма, полученного при обработке ретроспективной базы данных. Результаты сравнительной классификации приведены в таблице 19.

Таблица 19 — Сопоставление двух методов распределения пациентов по молекулярным фенотипам. Горизонтальные строки – определение методом ИГХ, столбцы – определение молекулярно-биологическим методом.

	%	Люминаль ный А	Люмина льный В_Her2 -	Люминаль ный В_Her2 +	Her2- позитивн.	Тройной негативн.
Люминальный А	62,5	15,0	5,0	3,0	1,0	0,0
Люминальный В_Her2 negativ	56,5	9,0	13,0	1,0	0,0	0,0
Люминальный В_Her2 pozitiv	53,3	4,0	3,0	8,0	0,0	0,0
Her2-позитивн.	88,9	0,0	1,0	0,0	8,0	0,0
Тройной негативный	60,0	1,0	1,0	1,0	1,0	6,0
Total	61,7	29,0	23,0	13,0	10,0	6,0

Приведенная таблица показывает, что общий процент совпадений не превышает 61,7%. Полученные в работе результаты совпадают с опубликованными в 2015-2016 гг. данными проспективных исследований, сравнивающих классификации на основании метода ИГХ и молекулярной классификации на основании коммерческой системы PAM50. Эти публикации показывают, что при планировании лечения на основе ИГХ происходит ошибочное назначение химиотерапии для пациентов группы с молекулярным фенотипом «Люминальный А», отнесенных ошибочно к более агрессивным фенотипам. А также не оправданное снижение программ лечения для групп, ошибочно отнесенных к люминальному фенотипу А. Процент ошибок, приводимый в этих публикациях, близок к величинам, полученным нами в проспективной группе.

Разработка моделей прогноза риска рецидивирования РМЖ. Значительное количество исследований посвящено вкладу адъювантной химиотерапии в снижение количества рецидивов, как местных, так и отдаленных, а также увеличению общей выживаемости для пациенток, имеющих различные неблагоприятные факторы прогноза. В тоже время, в большом количестве исследований показано, что эффект адъювантной химиотерапии при ранних стадиях рака не зависит от статуса N и незначителен на фоне гормональной терапии (Fisher B., 1997). Актуальность лечения ранних стадий РМЖ объясняется также тем, что внедрение современных программ скрининга и пропаганда необходимости регулярных обследований приводит к тому, что в ряде стран

выявление РМЖ на стадии N0 достигает 65-70% (Harbeck N, 2011). Таким образом, выявление дополнительных неблагоприятных факторов прогноза для пациентов с ранними стадиями РМЖ (T1,2, N0,1) является актуальной задачей современной онкомаммалогии. Была проведена оценка возможности использования анализа экспрессии предложенного нами профиля генов (24 гена с учетом референсных) в ткани РМЖ для построения модели прогноза рецидивирования.

Выбор пациентов. В исследование были включены блоки парафинизированной ткани РМЖ, полученные от 216 больных. Все пациентки получали лечение в ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» в период с 2001 по 2009 год. Критериями включения в исследование были размер опухоли до 5 см, отсутствие или не более 3 метастатических лимфоузлов по данным патоморфологического исследования, отсутствие неоадьювантной полихимиотерапии. В таблице 20 представлены основные клинико-морфологические характеристики исследованных образцов тканей пациенток данной группы.

Таблица 20 - Основные клинико-морфологические характеристики образцов парафинизированной ткани РМЖ.

Характеристика	Прогрессирование n (%)	Без прогрессирова ния n (%)	p
Размер опухоли			
T1 (<2 см)	46 (48%)	112 (43%)	0,56
T2 (2,0-4,9 см)	50 (52%)	148 (56%)	0,62
Метастазы в ЛУ			
N0	41 (43%)	135 (52%)	0,31
N1 (1-3 мтс л/у)	55 (57%)	125 (48%)	0,27
Степень дифференцировки			
1-2	69 (72%)	166 (64%)	0,23
3	27 (28%)	94 (36%)	0,44

Медиана наблюдения составила 93 [72,8 – 119,4 (25-75 процентиля)] месяца, прогрессирование отмечено в 109 (33,1%) случаях. В таблице 21 показана общая частота рецидивирования в обследованной группе пациенток.

Таблица 21 — Частота рецидивирования в обследованной группе образцов парафинизированной ткани РМЖ.

Рецидив	Частота	Процент
Да	109	29,1
Нет	220	58,8
Пропущено	45	12,0

Анализ результатов регрессионной модели Кокса для T, N и уровней экспрессии генов показал, что независимыми факторами прогноза являются, кроме T, N также

экспрессия ряда генов: STK15, Muc, MYBL2, BIRC5, Her2, MGB. Для поиска более эффективных алгоритмов прогноза рецидивирования были исследованы различные статистические методы многопараметрического анализа. На первом этапе исследован метод «деревьев классификации». В результате применения данного метода удалось найти решение с удовлетворительными параметрами эффективности, которые приведены в таблице 22.

Таблица 22 — Классификация пациенток на группы с прогрессированием и без прогрессирования на основании данных по экспрессии 21 гена. В модель входят также данные о возрасте пациента. Метод деревьев классификации.

	Да	Нет	% правильной классификации
Да	46	8	85,1
Нет	44	194	81,5

В таблице 22 по вертикали представлены предсказанные, по горизонтали – наблюдаемые значения прогноза.

Очевидно, что прогноз в значительной степени зависит от вида примененного лечения, поэтому был проведен анализ возможности построения прогноза заболевания в группах пациентов имеющих общие схемы лечения. Всего было сформировано 3 группы: 1 - группа только с адъювантной гормонотерапией (ГТ); 2 - группа с АПХТ; 3 - группа с ГТ и АПХТ (АПХТ+ГТ). Исследована возможность построения модели прогноза рецидивирования с применением метода дискриминантного анализа для группы пациенток, у которой применялась только адъювантная гормонотерапия (после хирургического этапа лечения), и показано, что результаты общей классификации риска рецидивирования существенно возрастают и составляют 93.7% (таблица 23).

Таблица 23 — Классификационная матрица дискриминантного анализа прогноза рецидивирования в группе пациенток РМЖ с программой лечения: хирургическое + адъювантная ГТ.

	%	Да	Нет
Да	71,4	10	4
нет	100,0	0	50
Всего\Средняя	93,7	10	54

Из таблицы 23 видно, что полученная модель со 100% вероятностью определяет пациенток, у которых при применении только ГТ не будет рецидива, в 29% классификационная матрица допускает ошибку (т.е. относит неблагополучного пациента в группу без рецидива), однако общая эффективность модели равна 93,7%. Эта величина сопоставима, и, в ряде случаев, превосходит существующие

модели прогноза. Если продолжить анализ в подгруппах, с различными схемами терапии и провести дискриминантный анализ для классификации пациенток на группы с рецидивом и без него, в группе, где применялась схема лечения, включающая хирургическое + АПХТ в комбинации с ГТ, то результаты предсказания рецидива составляют 87% (таблица 24).

Таблица 24 — Классификационная матрица дискриминантного анализа прогноза рецидивирования в группе пациенток с АПХТ в комбинации с ГТ.

	Percent	нет	да
нет	90,4	66	7
да	82,2	8	37
Total	87,2	74	44

Таким образом, использование метода дискриминантного анализа для построения моделей прогноза рецидивирования для групп пациенток с различными схемами лечения позволяет получить модели, имеющие высокую прогностическую эффективность.

Далее был проведен ROC анализ, который показал высокую эффективность классификации в моделях для изолированных групп. Вид ROC кривой для алгоритма классификации полученного для группы «хирургическое лечение + ГТ» приведен на рисунке 12 (площадь под кривой составила 0.943).

Алгоритм применения полученных методов прогноза в общем виде выглядит так: на основании полученных значений уровней экспрессии в ткани опухоли вычисляются значения 3-х функций (канонические функции) и оценивается риск рецидивирования (в процентах от 0 до 100). На основании полученных вариантов решения предлагается следующий алгоритм использования полученных результатов (таблица 25). Наименьшее значение риска рецидивирования, полученное для 3-х возможных вариантов терапии является рекомендацией для выбора данной схемы лечения. Например: если получен «низкий» риск рецидивирования для всех возможных вариантов лечения, то для этой опухоли можно ограничиться только проведением адьювантной гормонотерапии. Если при решении канонических функций получен высокий риск для группы «ГТ» и низкий риск для группы «ГТ+АПХТ», то это является рекомендацией для этой пациентки использования ГТ в сочетании с АПХТ.

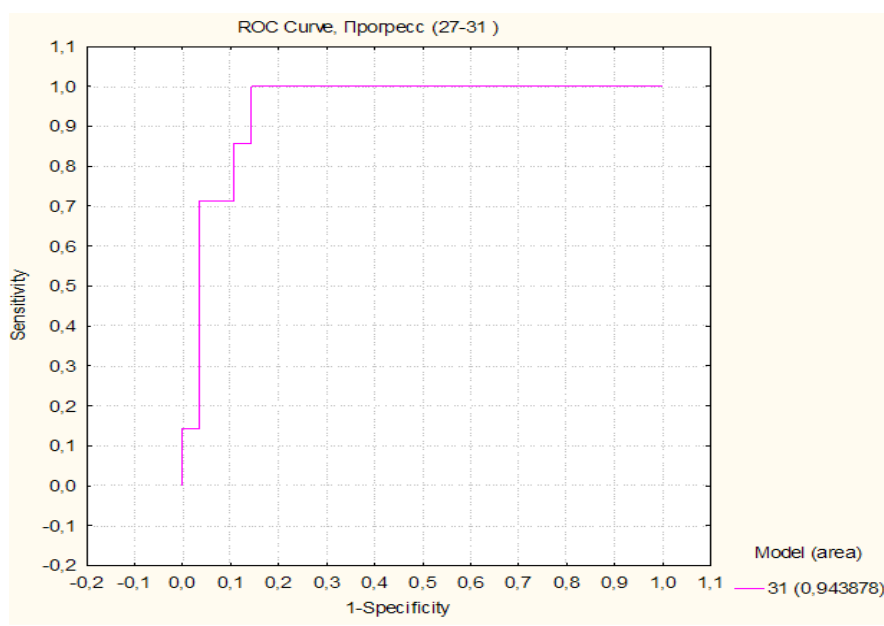


Рисунок 12 — ROC кривая для алгоритма классификации полученного для группы пациенток со схемой лечение «хирургическое + ГТ».

Таблица 25 — Таблица оценки риска рецидива на основании молекулярно-генетических характеристик ткани РМЖ.

Индекс рецидива (вероятность принадлежности к группе на основании значения канонической функции)	Интерпретация		
	Схема терапии (хирургическое +)		
	АПХТ	ГТ	ГТ+АПХТ
<40	Низкий	Низкий	Низкий
40-60	Средний	Средний	Средний
>60	Высокий	Высокий	Высокий

Разработка математической модели определения риска локо-регионального рецидивирования (ЛРР) у пациенток с РМЖ при радикальной резекции. В связи с общей тенденцией увеличения доли ранних стадий в группе впервые выявленных РМЖ увеличивается количество пациентов, которым может быть показано органосохраняющее лечение. В тоже время, критерии, объективизирующие программы лечения для таких пациентов остаются до конца не ясными, т.к. даже при отсутствии локального распространения и малого размера опухоли часть из них могут иметь неблагоприятный прогноз, связанный с особенностями молекулярного фенотипа. Поэтому разработка дополнительных критериев выявления факторов неблагоприятного прогноза в группе пациентов, которым показано органосохраняющее лечения является актуальным.

Было проведено исследование возможности использования анализа разработанного нами профиля генов в ткани опухоли для прогноза развития ЛРР при радикальных резекциях. Для этого выделили подгруппу пациенток, которым было проведено органосохраняющее лечение по поводу РМЖ из группы проанализированных пациенток. На основании данных дискриминантного анализа показателей экспрессии 21 гена в ткани РМЖ и величины Т и N были получены следующие данные: оценка риска развития ЛРР была правильно получена в 95% случаев, а отсутствие его появления в 97% случаев (таблица 26).

Таблица 26 — Матрица классификации прогноза локо-регионального рецидива при радикальной резекции РМЖ на основании анализа уровня экспрессии генов в ткани опухоли (дискриминантный анализ).

Прогностические данные / Клинические группы	Прогноз локорегионарного рецидива (кол-во чел.)	Прогноз ремиссии (кол-во чел.)	Процент
ЛРР+	21	1	95%
ЛРР-	1	36	97%
Общее количество	22	37	100%

Таким образом, объединяя данные клинического и молекулярно-генетического исследований, удалось создать алгоритм прогноза ЛРР с эффективностью 95%.

Суммируя приведенные в этом разделе результаты работы можно констатировать, что использование многомерных методов анализа профиля экспрессии генов в ткани опухоли, позволяет получить эффективные модели прогноза как отдаленного, так и местного рецидивирования РМЖ.

ВЫВОДЫ

1. Уровень экспрессии маммаглобина в ткани РМЖ значимо выше, чем в окружающей ткани МЖ и ткани МЖ при доброкачественных заболеваниях. Наиболее значительное повышение характерно для ранних стадий РМЖ (Т1-2, N0-1). Обнаружение мРНК маммаглобина в периферической крови, как метод диагностики РМЖ, показал специфичность – 93,0%, чувствительность 61,0%. Не обнаружена экспрессия мРНК маммаглобина в крови при другой локализации опухолевого процесса (рак шейки матки, эндометрия, предстательной железы, рак почки, рак желудка).

2. Увеличение размеров опухоли, появление метастазов и увеличение степени злокачественности сопровождается повышенной экспрессией BIRC5, STK15, BAX, CTSL2, c-erbB2, GRB7 и сниженным уровнем PTEN и MGB1. Анализ уровня экспрессии мРНК исследуемых генов показал, что в ряду патологически

неизменная ткань – фиброаденома - РМЖ наблюдается повышение экспрессии маркеров пролиферации KI67, STK15 и CCNB1, ингибитора апоптоза BIRC5 и матриксной металлопротеиназы MMP11, снижение экспрессии ингибиторов пролиферации PTEN и NDRG1.

3. Молекулярно-биологическое исследование образца ткани молочной железы, включающее определение уровня экспрессии таких генов, как Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1 позволяет с высокой достоверностью отличить доброкачественную и злокачественную ткань молочной железы в случаях, когда постановка диагноза клинико-радиологическими методами затруднена. Включение молекулярно-биологического исследования в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики с 81% до 96%.

4. Оптимизация методики анализа мРНК в парафинизированной ткани (подбор условий выделения, проведения реакции, подбор праймеров и ампликонов, выбор исследуемых генов) позволила разработать диагностические наборы для исследования заболеваний МЖ.

5. Использование комплекса многопараметрических методов (метод К-средних, алгоритм «деревьев» классификации, дискриминантный анализ, нейронные и Байесовские сети) позволило на основании экспрессионного профиля провести устойчивую кластеризацию образцов тканей РМЖ на 5 групп соответствующих классическим молекулярным фенотипам.

6. Разработан алгоритм применения оригинального диагностического набора реагентов для определения молекулярных фенотипов РМЖ на основе анализа мРНК 24 генов методом РВ-ПЦР в парафиновых блоках, позволяющий повысить эффективность определения фенотипа РМЖ.

7. Разработаны алгоритмы оценки риска рецидивирования РМЖ в зависимости от планируемой адъювантной терапии и объема хирургического этапа лечения, позволяющие индивидуализировать программы лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В качестве способа диагностики заболеваний молочной железы предлагается к применению разработанная тест-система на основании обнаружения изменения уровня экспрессии генов Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1 методом количественной ПЦР в гистологических образцах молочной железы. Материал, необходимый для молекулярно-биологического исследования, отбирается в ходе прицельной тонкоигольной биопсии. В случае увеличения экспрессии мРНК одного и более генов из группы, включенных в молекулярно-биологический

алгоритм и имеющих значения больше критического, врачами клинической лабораторной диагностики или врачами-генетиками делается заключение о возможности злокачественного характера процесса и целесообразности дальнейшего обследования пациента профильными специалистами.

Применение молекулярно-генетических технологий для уточняющей диагностики изменений молочной железы возможно как на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи, так и в практике работы специализированных стационарных учреждений врачами клинической лабораторной диагностики/врачами-генетиками в условиях клиничко-диагностических лабораторий. С целью оптимизации лечебно-диагностического процесса рекомендуется внесение изменений в клинический алгоритм обследования пациенток с доброкачественными и злокачественными новообразованиями молочной железы. Использование предложенных технологий, уточняющей диагностики заболеваний МЖ, уменьшает период времени, затраченный на постановку диагноза, пребывание пациента в стационаре, снижает риск неоправданных хирургических вмешательств вследствие ложноположительных цитологических заключений о характере процесса.

Для использования в клинической практике предлагается метод диагностики ранних стадий РМЖ на основе обнаружения мРНК маммаглобина в периферической крови, описанный в диссертации.

Определение молекулярного фенотипа ткани при РМЖ вошло в стандарты обследования пациентов с этой патологией. Разработанный способ оценки молекулярного фенотипа методом РВ-ПЦР, основанный на анализе экспрессии генов в ткани опухоли с использованием оригинальных тест-систем, более эффективен в сравнении с рутинным ИГХ методом.

На основании анализа профиля экспрессии генов в ткани первичной опухоли с использованием оригинальных тест-систем, предложены алгоритмы формирования неблагоприятных групп прогноза для ранних стадий РМЖ. Разработанные инструкции к тест-системам подробно описывают процедуры и порядок их применения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Васкевич Е.Ф. Исследование экспрессии мРНК Маммаглобина у пациенток с различной патологией молочной железы/ Васкевич Е.Ф., **Кудинова Е.А.**, Джикия Е.Л., Буйнова Д.А., Боженко В.К.//Материалы VI международной конференции "Молекулярная медицина и биобезопасность". - М.-2009. С.53
2. Боженко В.К. Использование определения экспрессии тканеспецифической мРНК для диагностики метастазов рака. / Боженко В.К., Рожкова Н.И., Ташян А.А., **Кудинова Е.А.**, Васкевич Е.Ф.// Материалы VII съезда онкологов России. - М.-2009. С. 57.

3. Боженко В.К. Исследование экспрессии мРНК маммаглобина А при различной патологии молочных желез/ Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., Чазова Н.Л., Мельникова Н.В., **Кудинова Е.А.**, Джикия Е.Л., Буйнова Д.С.//Вестник РНЦРР. – 2009. Выпуск 9. URL http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v9/papers/bozhenko_v9.htm
4. Рожкова Н.И. Молекулярно-биологические и радиологические технологии в комплексной диагностике патологии аксиллярной области/ Рожкова Н.И., Боженко В.К., Фомин Д.К., Плошница А.И., Ташан А.А., **Кудинова Е.А.**, Васкевич Е.Ф., Мазо М.Л.// Опухоли женской репродуктивной системы. - 2009. -№3-4.-С.25-28.
5. Боженко В.К. Возможности оценки экспрессии маммаглобина при различной патологии молочной железы. Литературный обзор/ Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., **Кудинова Е.А.**, Чазова Н.Л., Берщанская А.М., Мельникова Н.В., Тащян А.А., Слонов А.В.//Вестник РНЦРР. - 2010. Выпуск 10. URL http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v10/papers/bozhe_v10.htm
6. **Кудинова Е.А.** Экспрессия маркеров апоптоза при раке молочной железы/Кудинова Е.А., Бурменская О.В., Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., Непша О.С., Мельникова Н.В., Троценко И.Д., Трофимов Д.Ю., Сухих Г.Т.//Технологии живых систем.- 2011.- Т.8.- №7.- С.40-44.
7. Боженко В.К. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при раке молочной железы/ Боженко В.К., Рожкова Н.И, **Кудинова Е.А.**, Троценко И.Д.//Вестник РНЦРР.- 2011.- Т.11. Доступно по URL http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh2_v11.htm
8. Боженко В.К. Профиль экспрессии генов как фактор прогноза при гиперпролиферативных заболеваниях органов репродуктивной системы/Боженко В.К., Харченко Н.В., Запиров Г.М., **Кудинова Е.А.**, Троценко И.Д.//Вестник РНЦРР, 2012, Т. 12, URL http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/trots_v12.htm.
9. Троценко И.Д. Оценка связи экспрессии рецепторов стероидных гормонов методом ОТ-ПЦР с уровнем пролиферации и апоптоза в ткани рака молочной железы/ Троценко И.Д., Рожкова Н.В., Харченко Н.В., **Кудинова Е.А.**, Запиров Г.М., Боженко В.К.// Вестник РНЦРР.-2012.-Т. 12. URL http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/trots1_v12.htm
10. Bozhenko V.K. Mammaglobin expression as a marker for early breast cancer/ Bozhenko V.K., Rozhkova N.I., **Kudinova E.A.**, Vaskevich E. N., Bliznyukov O.P., Trotsenko I.D.// 4th WIN Symposium.- 2012.- Paris, France.- June 28-29//Annals of oncology.- 2012.- V.23.- P 17.
11. Рожкова Н.И. Лучевая и цитометрическая диагностика локального фибросклероза молочной железы/ Рожкова Н.И., Боженко В.К., **Кудинова Е.А.**, Кулинич Т.М., Запирова С.Б.// Опухоли женской репродуктивной системы. -2006.- № 3.- С. 26-29.
12. Боженко В.К. Анализ профиля экспрессии генов в ткани рака молочной железы/ Боженко В.К., Трофимов Ю.Д., Бурменская О.В., **Кудинова Е.А.**, Васкевич Е.Ф.//IV Съезда Научного общества специалистов клинической лабораторной диагностики России. Научно-практическая конференция "Лабораторная наука - практике: первое десятилетие XXI века". Клиническая лабораторная диагностика.- 2010. - № 9. -С. 48-48а.
13. Боженко В.К. Анализ изменения профиля экспрессии генов при гиперпролиферативных заболеваниях шейки матки/Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., Трофимов Д.Ю., Бурменская О.В., **Кудинова Е.А.**//Клиническая лабораторная диагностика.-2011.-№ 9.-С. 21.

14. Боженко В.К. мРНК маммаглобина периферической крови – новый маркер рака молочной железы/ Боженко В.К., Васкевич Е.Ф., **Кудинова Е.А.**//Клиническая лабораторная диагностика.- 2011.- № 9. - С. 20-21.
15. Фролов И.М. Клинические и молекулярно-генетические особенности первично-множественного рака. Литературный обзор/ Фролов И.М., **Кудинова Е.А.**, Рожкова Н.И.//Вестник Российского научного центра рентгено радиологии Минздрава России. 2012.- № 12. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/frolov_v12.htm
16. Троценко И.Д. Анализ связи клинико-морфологических и молекулярных особенностей опухоли с рентгенологической плотностью окружающей ткани при раке молочной железы/Троценко И.Д., Боженко В.К., Харченко Н.В., **Кудинова Е.А.**, Ооржак А.В., Якобс О.Э., Рожкова Н.И., Солодкий В.А.// Вестник РНЦРР. - 2012.-№ 12. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/trots3_v12.htm.
17. **Кудинова Е.А.** Связь уровня апоптоза и экспрессии рецепторов эстрогена при раке молочной железы/Кудинова Е.А., Кулинич Т.М., Мельникова Н.В., Ооржак А.В., Боженко В.К.//Вестник РНЦРР.-2012.- № 12. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/kud_v12.htm
18. Боженко В.К. Анализ экспрессии генов пролиферации и апоптоза в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов при раке молочной железы/ Боженко В.К., Харченко Н.В., Запиров Г.М., **Кудинова Е.А.**, Троценко И.Д., Солодкий В.А.// Вестник РНЦРР. -2012. - № 12. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/bozhenko1_v12.htm
19. Боженко В.К. Связь экспрессии маммаглобина с рентгенологическими признаками при фиброаденоме молочной железы/ Боженко В.К., Харченко Н.В., Васкевич Е.Ф., **Кудинова Е.А.**, Ооржак А.В., Якобс О.Э., Троценко И.Д.// Вестник РНЦРР.- 2012. -№ 12. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/trots2_v12.htm.
20. Боженко В.К. Определение экспрессии мРНК маммаглобина как маркера раннего рака молочной железы/ Боженко В.К., Солодкий В.А., Харченко Н.В., Троценко И.Д., Трофимов Д.Ю., **Кудинова Е.А.**, Васкевич Е.Ф., Бурменская О.В.//Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.- 2013.-№ 2.-С. 71-77.
21. Боженко В.К. Анализ экспрессии генов пролиферации и апоптоза в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов при раке молочной железы/ Боженко В.К., **Кудинова Е.А.**, Харченко Н.В., Запиров Г.М., Троценко И.Д.//Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина.- 2013.- № 4.- С. 10-19.
22. Боженко В.К. Анализ экспрессии генов в фиброаденоме молочной железы/ Боженко В.К., Харченко Н.В., **Кудинова Е.А.**, Пасько М.А., Фролов И.С., Ооржак А.В., Троценко И.Д.// Вестник РНЦРР. -2013.- № 13. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v13/papers/oorzhak_v13.htm
23. Троценко И.Д. Анализ экспрессии цитокератина-19 в лимфатических узлах для верификации метастазов рака молочной железы/ Троценко И.Д., Тащян А.А., Запиров М.М., Широких И.М., **Кудинова Е.А.**, Боженко В.К., Солодкий В.А.// Вестник РНЦРР. -2014. - № 4. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v14/papers/bozhenko_v14.htm
24. Троценко И.Д. Генетические особенности рака молочной железы в группах прогрессирования после радикальных мастэктомий и органосохраняющего лечения/ Троценко И.Д., Пасько М.А., Захаренко М.В., **Кудинова Е.А.**, Чхиквадзе

В.Д., Боженко В.К.// Вестник РНЦРР.-2015.
http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v15/papers/trotsenko_v15-3.htm.

25. Рожкова Н.И. Лучевая и цитометрическая диагностика локального фибросклероза молочной железы/ Рожкова Н.И., Боженко В. К., **Кудинова Е.А.**, Кулинич Т.М., Запирова С.Б.// Маммология.- 2006.- №3.- с. 26-29.

26. Рожкова Н.И. Оценка экспрессии цитокератина 19 на уровне мРНК в лимфатических узлах как диагностического маркера метастазов/ Рожкова Н.И., Боженко В.К., Плошница А.И., Ташян А.А., **Кудинова Е.А.**, Мазо М.Л.// Вестник РАР.-2009.- №1.- С.71.

27. **Кудинова Е.А.** Оценка соотношения пролиферации и апоптоза при патологических процессах молочной железы/ **Кудинова Е.А.**// Вестник РАР. - 2009.- №1.-С.79-85.

28. Рожкова Н.И. Иммуногистохимический анализ основных маркеров пролиферации, апоптоза и онкобелков при гиперпластических и предраковых процессах молочной железы/ Рожкова Н.И., Боженко В.К., Близнюков О.П., **Кудинова Е.А.**, Мельникова Н.В.// Технология, ФС №2011/003 от 03.02.11.
<http://www.roszdravnadzor.ru/archive>

29. Боженко В.К. Прогностическое значение Циклина D1 в раке молочной железы/ Боженко В.К., Близнюков О.П, **Кудинова Е.А.**, Мельникова Н.В.// Технология, ФС №2011/012 от 03.02.11. <http://www.roszdravnadzor.ru/archive>

30. Рожкова Н.И. Комплексная лучевая молекулярно-генетическая диагностика заболеваний, локализуемых в аксиллярной области/ Рожкова Н.И., Боженко В.К., Фомин Д.К., Плошница А.И., Ташян А.А., **Кудинова Е.А.**, Васкевич Е.Ф., Мазо М.Л.// Сборник научных работ «Роль новых радиологических технологий в диагностике и лечении заболеваний молочных желез и органов малого таза у женщин» г.Астана.-2012.- с.135-139.

31. Vozhenko V.K. Progesterone receptor expression in a molecular differential diagnosis of early breast cancer/ Vozhenko V.K., Rozhkova N.I., Kharchenko N.V., **Kudinova E.A.**, Zapirov G.M., Trotsenko I.D.// ICGO-2012-Int.Congress Gynaecology and Obstetrics Guanchou, China.

32. Боженко В.К. Анализ экспрессии генов при фиброаденоме и раке молочной железы/ Боженко В.К., Рожкова Н.И., Харченко Н.В., **Кудинова Е.А.**, Кулинич Т.М., Запиров Г.М., Троценко И.Д., Ооржак А.В., Солодкий В.А. //Материалы II Междисциплинарного форума «Медицина молочной железы» 24-26 февр.- 2012. – Москва. – с. 6-8.

33. Мельникова Н.В. Оценка экспрессии мРНК гена p16 при цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки/Мельникова Н.В., Боженко В.К., Ашрафян Л.А., Антонова И.Б., Алешикова О.И., Бурменская О.Н., Трофимов Д.Ю., Кудинова Е.А., Хунова Л.З., Двинских Н.Ю.//Вестник РНЦРР.- 2012.
http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v12/papers/meln_v12.htm

34. Боженко В.К. Анализ профиля экспрессии генов как метод прогноза в онкологии/ Боженко В.К., **Кудинова Е.А.**, Ооржак А.В., Солодкий В.А.// Сборник научных работ «Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторной медицины» 26–28 марта.- 2013. -Москва

35. Боженко В.К. Анализ молекулярного портрета ткани опухоли с целью получения прогностических индексов/ Боженко В.К., Троценко И.Д., **Кудинова Е.А.**, Ооржак А.В., Солодкий В.А.// Материалы VIII съезда онкологов и радиологов СНГ и Евразии, 16-18 сентября 2014.

36. Боженко В.К. Прогноз рецидивов РМЖ: анализ экспрессии генов/ Боженко В.К., Харченко Н.В., **Кудинова Е.А.**, Троценко И.Д.//Материалы III Междисциплинарного форума «Медицина молочной железы» 23–24 мая 2014 года, Москва
37. Trotsenko I.D. Mammaglobin mRNA as an early breast cancer marker in peripheral blood and tumor tissue/ Trotsenko I.D., Bozhenko V.K., Vaskevich E.F., Kharchenko N.V., **Kudinova E.A.**, Oorzhak A.V., Rozhkova N.I., Solodky V.A. // Circulating biomarkers.- 2014.- 24-25 March.- Boston.- USA.
38. Боженко В.К. Новые технологии в анализе молекулярно-генетических маркеров в парафиновых срезах опухолей/ Боженко В.К., Троценко И.Д., **Кудинова Е.А.**// Материалы XVIII Форума «Национальные дни лабораторной медицины России» 1 – 3 октября 2014.
39. **Кудинова Е.А.** Оценка уровня генетической нестабильности, пролиферативной активности и апоптоза в ткани рака молочной железы в зависимости от уровня онкобелка C-ERBB-2/ Кудинова Е.А., Боженко В.К., Мельникова Н.В., Ооржак А.В.// Материалы XIX Форума «Национальные дни лабораторной медицины России».-М.-23-25.09.2015.
40. Пасько М.А. Прогностические возможности профиля экспрессии генов в определении риска рецидивирования рака молочной железы после органосохраняющего лечения/ Пасько М.А., Захаренко М.В., Троценко И.Д., **Кудинова Е.А.**, Чхиквадзе В.Д., Боженко В.К.// Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. 2016. -Т. 5. -№ 3. -С. 27-32.
41. Боженко В.К. Особенности экспрессии генов пролиферации и апоптоза при цервикальной интраэпителиальной неоплазии и раке шейки матки/ Боженко В.К., Ашрафян Л.А., Мельникова Н.В., Бурменская О.В., Трофимов Д.Ю., **Кудинова Е.А.**, Хунова Л.З., Близнюков О.П.// Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2011. -Т. 9.- № 12.- С. 54-58
42. Пасько М.А. Определение риска локорегиональных рецидивов рака молочной железы после органосохраняющего лечения на основе анализа экспрессии генов/ Пасько М.А., Захаренко М.В., Троценко И.Д., **Кудинова Е.А.**, Чхиквадзе В.Д., Боженко В.К.// Вестник РНЦРР.- 2015. http://vestnik-rncrr.ru/vestnik/v15/papers/Zakharenko_v15.htm.
43. Bozhenko V.K. A prospective comparison of the method of determining the molecular phenotype of breast cancer on the basis of multigenic panel OncoQuantex and surrogate ICH method/ Bozhenko V.K., **Kudinova E.A.**, Trotsenko I.D., Solodkij V.A.// XXXI International Congress of the IAP and 28th Congress of the ESP 25 - 29 September 2016.- Cologne, Germany.- Publ.in: Virchows Arch.- 2016 469 (Suppl 1):S1-S346
44. Bozhenko V. K. Mammaglobin in Peripheral Blood and the Tumor of Breast Cancer Patients/ Bozhenko V. K., Kharchenko N. V., Vaskevich E. F., **Kudinova E. A.**, Oorzhak A. V., Rozhkova N. I., Trotsenko I. D.// Biochemistry (Moscow), Series B: Biomedical Chemistry.- Vol. 10.- No. 1.- 2016.- p.75-80
45. Боженко В.К. Лабораторные методы исследования. Боженко В.К., Борисов В.И., Бурдина И.И., Возный Э.К., Волченко Н.Н., Гуров С.Н., Дабагов А.Р., Добровольская Н.Ю., Ермощенко М.В., Запирова С.Б., Зикиряходжаев А.Д., Зубарев А.В., Каприн А.Д., Киреева М.Н., Киселев В.И., Кондаков А.В., **Кудинова Е.А.**, Мазо М.Л., Меладзе Н.В., Микушин С.Ю. и др.// Маммология.Национальное руководство под редакцией А.Д. Каприна, Н.И. Рожковой. Москва, 2016. Сер.

Национальные руководства (2-е издание, переработанное и дополненное). - Глава 11. - с.209-238.

46. Боженко В.К. Маммаглобин в периферической крови и опухоли при раке молочной железы/ Боженко В.К., Харченко Н.В., Васкевич Е.Ф., **Кудинова Е.А.**, Ооржак А.В., Рожкова Н.И., Троценко И.Д.//Биомедицинская химия. -2016.- Т. 62.- № 4. -С. 453-457.

47. Патент. 2464570 Российская Федерация, МПК G01N33/53. Метод диагностики цервикальных интраэпителиальных неоплазий / Боженко В.К., Кудинова Е.А., Близнюков О.П., Мельникова Н.В., Бурменская О.В.; заявитель и патентообладатель ФГУ "РНЦРР" Минздравсоцразвития России (RU). - № 2010147074/15; заявл. 19.11.2010; опубл. 20.10.2012, Бюл. №29 – 9 с.

48. Боженко В.К. Анализ уровня экспрессии генов при гиперпролиферативных заболеваниях молочной железы/Боженко В.К., Рожкова Н.И., **Кудинова Е.А.**, Кулинич Т.М., Троценко И.Д., Ооржак А.В., Солодкий В.А.// Вестник РНЦРР.- 2011.- http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v11/papers/bozh1_v11.htm

49. Боженко В.К. Анализ пролиферативной активности и апоптоза при гиперпластических процессах молочной железы/Боженко В.К., **Кудинова Е.А.**, Мельникова Н.В., Близнюков О.П.// Вестник РНЦРР. -2010. <http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v10/v10.htm#P0>

50. Ташян А.А. Методы диагностики и стадирования регионарного распространения рака молочной железы/ Ташян А.А., Троценко И.Д., **Кудинова Е.А.**, Запиров М.М., Захаренко М.В.// Вестник РНЦРР.- 2015. <http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v15/v15.htm>

51. Ташян А.А. Морфологические и молекулярно-генетические методы диагностики метастазов в сигнальном лимфоузле при раке молочной железы/ Ташян А.А., Троценко И.Д., **Кудинова Е.А.**, Запиров М.М., Захаренко М.В.//Вестник РНЦРР.- 2015. http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v15/papers/tyashan_aa_v15.htm

52. Рожкова Н.И. Содержание мРНК цитокератина 19 в лимфатических узлах как диагностический маркер метастазов / Рожкова Н.И., Боженко В.К., Плошница А.И., Ташян А.А., **Кудинова Е.А.**, Мазо М.Л.// Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2008.- Т. 145. -№ 1.- С. 97-100.

53. Боженко В.К. Анализ экспрессии генов пролиферации и апоптоза пи цервикальных интраэпителиальных неоплазиях и раке шейки матки/ Боженко В.К., Ашрафян Л.А., Антонова И.Б., Мельникова Н.В., Бурменская О.Н., Трофимов Д.Ю., **Кудинова Е.А.**, Хунова Л.З., Слонов А.В., Близнюков О.П.// Опухоли женской репродуктивной системы. 2011. -№ 4. -С. 72-76.

54. Bozhenko V. Expression of biomarkers in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia/ Bozhenko V., Kreynina Y., Ashrafyan L., Mellnikova N., Antonova I., **Kudinova E.**, Aleshikova O., Burmenskaya O., Dvinskih N., Trofimof D., Solodkiy V.// International Gynecologic Cancer Society Regional Meeting, April 11-13, 2013, Bali. The International Journal of Gynecological Cancer – 2013.-Volume23.-Supplement1.- p.76.

Список использованных сокращений

АПХТ — адьювантная полихимиотерапия

ГТ — гормональная терапия

РМЖ — рак молочной железы

ИПР - инфильтративный протоковый рак

ИДР - инфильтративный дольковый рак

ЛРР — локорегионарный рецидив

ЛР — локальный рецидив

РМЭ — радикальная мастэктомия

ЛТ — лучевая терапия

ИГХ — иммуногистохимическое исследование

ЭР — рецепторы эстрогена

РП — рецепторы прогестерона

МЖ — молочная железа

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР (РВ-ПЦР) — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (в реальном времени)

мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота

МНТ — морфологически неизменная ткань

ФА — фиброаденома

о.е. — относительные единицы экспрессии