

ФГБУ НИИ  
онкологии  
им. Н.Н. Петрова  
Минздравсоцразвития  
России,  
Санкт-Петербург

*За прошедшее десятилетие был разработан целый ряд мультигенных молекулярных тестов, направленных на совершенствование диагностики и лечения онкологических заболеваний. Перспективность маркеров этого класса не вызывает никаких сомнений.*

# ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Е.Н. Имянитов

## Введение

Революция в методологиях молекулярно-генетического анализа по праву считается одним из самых заметных достижений биомедицинской науки прошедшего десятилетия. Действительно, в распоряжении учёных стали появляться принципиально новые подходы, позволяющие в тысячи раз увеличить скорость накопления информации о структуре ДНК, РНК и белков. Соответствующие методы имеют несколько альтернативных названий в англоязычной научной литературе; в частности, применяются термины high throughput technologies (высокопроизводительные технологии), profiling (изучение «профилей» биомолекул), arrays (массивы данных), microchips (микрочипы) и т.д.

Онкология является безусловным лидером по применению высокопроизводительных методов анализа биомолекул [21]. К настоящему времени накоплено и обработано огромное количество информации. Не вызывает сомнения, что определённая часть исследований в этой области может иметь непосредственное клиническое значение, если не сейчас, то в недалёком будущем. Тем не менее, адекватная интерпретация результатов мультигенных тестов требует высокого уровня взаимопонимания между специалистами по молекулярной генетике, биоинформатике и клинической онкологии, и, по понятным причинам, зачастую вызывает значительные затруднения. В настоящей работе мы попытаемся прокомментировать основные достижения и спорные аспекты «микрочиповых» исследований.

## Методы высокопроизводительного анализа биомолекул

Наибольшую известность получили эксперименты, направленные на изучение профилей РНК – т.н. транскриптомные исследования [2]. Их идея заключается в том, что одним из самых доступных показателей активности гена является интенсивность его экспрессии на уровне РНК, т.е. количество специфической РНК, присутствующее в клетке. Соответственно, при исследовании транскриптома из исследуемого материала (как правило, опухоли), выделяется т.н. тотальная РНК. Далее проводится реакция обратной транскрипции, в которой на матрице РНК при помощи фермента обратной транскриптазы синтезируется комплементарная ДНК (кДНК). кДНК подвергается мечению при помощи флуоресцентного зонда и гибридизуется с «микрочипами», на которых представлен полный набор генов человека (или, при необходимости, другого исследуемого организма). Активно экспрессирующиеся гены продуцируют множественные РНК-транскрипты, и, соответственно, молекулы меченой кДНК, что в конечном счёте приводит к высокой интенсивности гибридизационного сигнала. Напротив, «молчащие» гены при подобном исследовании не оставляют своих отпечатков на микрочипе. Таким образом, транскриптомный анализ позволяет одновременно оценить уровень экспрессии всех генов человека (более 25000) в каждом отдельном образце биоматериала (рис. 1).

К недостаткам транскриптомных методов относят высокие требования к количеству и сохранности изучаемых тканей (в частности, необходимость использования свежемороженых биобразцов с массой не менее 0.5 г), относительно низкую чувствительность и излишнюю комплексность получаемых данных. На основе результатов экспрессионного профилирования опухолей разработаны т.н.

Анализ экспрессии 24000 mRNA на микрочипе 4X72K (Roche NimbleGen, USA)

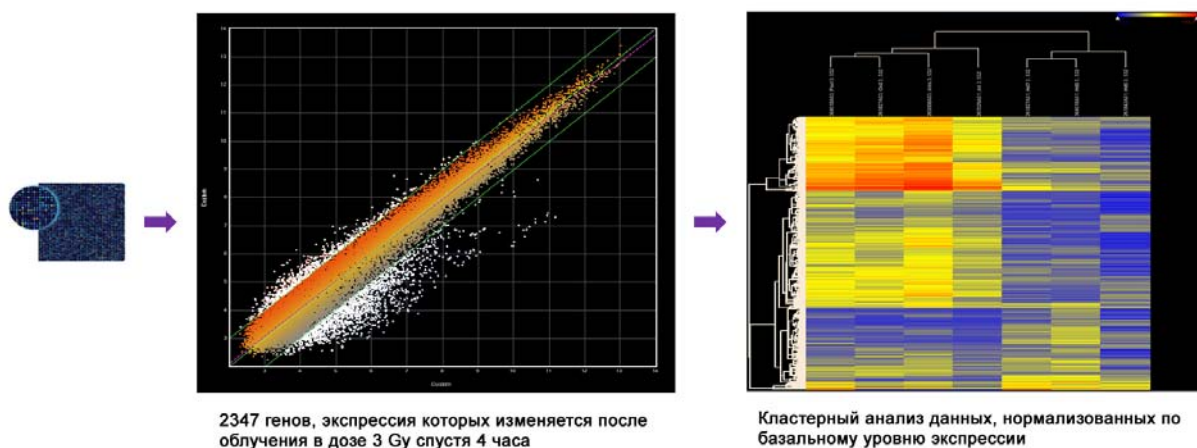


Рис. 1. Пример транскриптомного анализа. Рисунок предоставлен к.б.н. Е.Ш. Кулигиной и к.м.н. А.П. Соколенко.

Human miRNA Microarray Rel.12.0 (Agilent Technologies)

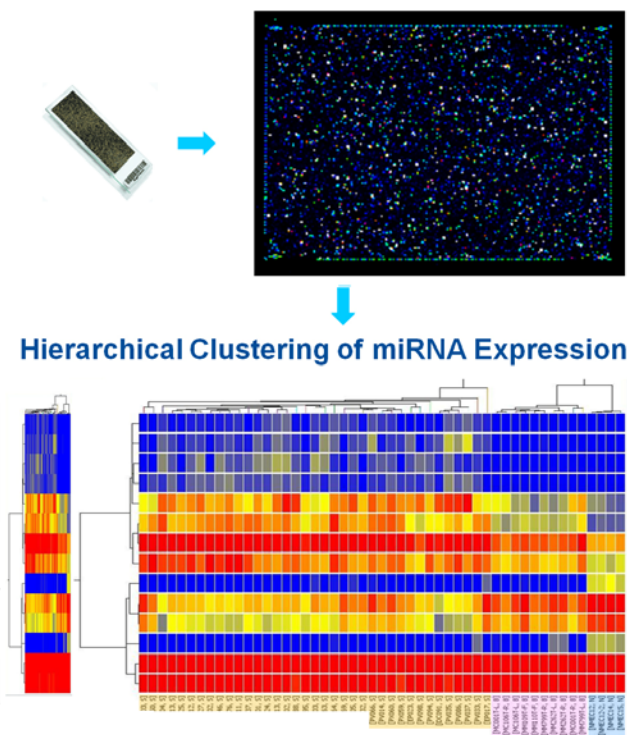


Рис. 2. Пример «микрочипового» анализа экспрессии микроРНК. Рисунок предоставлен А.Г. Иевлевой.

мультигенные тесты, основанные на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР; polymerase chain reaction, PCR). Для ПЦР-анализа допустимо использовать частично деградированные молекулы РНК, поэтому в качестве источника материала могут выступать не только «свежие» опухоли, но и архивные парафиновые блоки. Использование архивного материала имеет существенные преимущества, т.к. позволяет осуществлять микродиссекцию опухолевых клеток и таким образом снижает риск получения артефактных результатов. Как и в случае транскриптомного анализа, непосредственно в аналити-

ческой реакции используется кДНК, которая синтезируется на матрице РНК; именно поэтому само название ПЦР-анализа экспрессии генов обычно включает упоминание об обратной транскрипции (RT-PCR, reverse transcription PCR). Современные форматы ПЦР предусматривают мониторинг кинетики накопления продукта в режиме реального времени (real-time PCR), что позволяет осуществлять исключительно точную оценку количества исходной матрицы. Уровень экспрессии генов оценивают по соотношению ПЦР-продуктов исследуемого гена и гена-рефери [13].

Custom CGH 385K Array (Roche Nimblegen). Paired tumors, BiBC patient #15

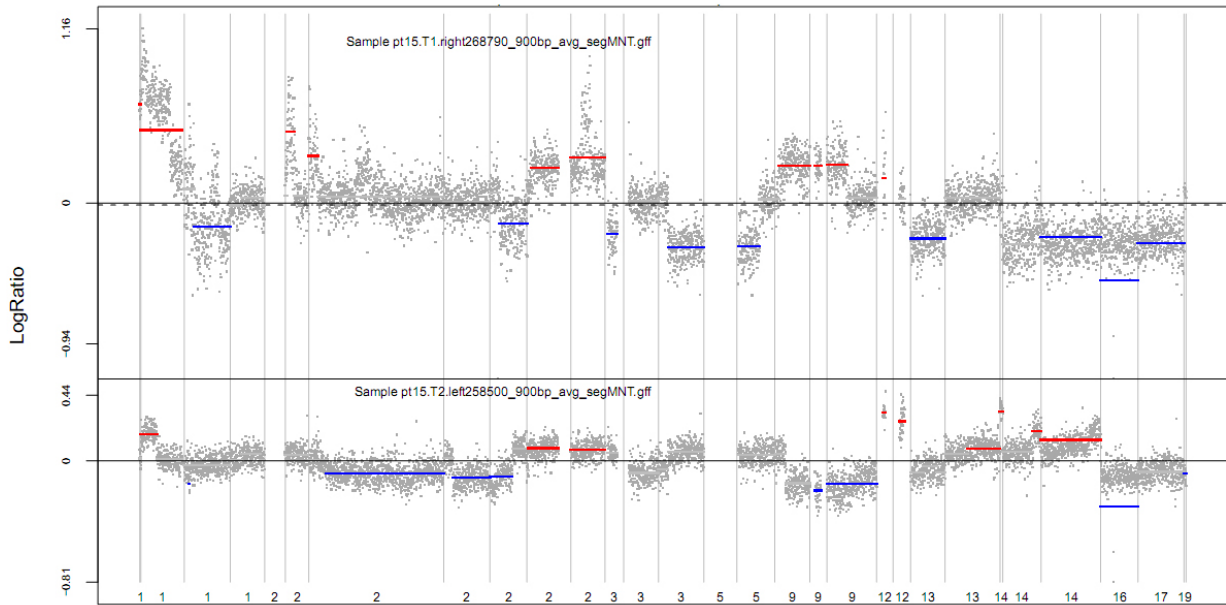


Рис. 3. Пример анализа опухолей молочной железы посредством компаративной геномной гибридизации. Рисунок предоставлен к.б.н. Е.Ш. Кулигиной.

Наиболее ярким событием биологии прошедшего десятилетия стало открытие роли микроРНК в регуляции экспрессии генов. МикроРНК представляют из себя короткие молекулы, способные связываться с комплементарными участками матричной РНК. В отличие от длинных молекул РНК, микроРНК отличаются относительной устойчивостью и неплохо сохраняются в различных биологических образцах. В настоящее время идентифицировано около тысячи различных микроРНК. Их изучение осуществляется как с помощью микрочипов (рис. 2), так и посредством RT-PCR [11].

Другой общепризнанной разновидностью микрочиповых технологий является группа прецизионных методов, объединяемых термином «компаративная геномная гибридизация» (comparative genomic hybridization, CGH). В этом случае в качестве объекта исследования выступает тотальная ДНК, выделенная из биологического образца. Эта ДНК метится флуоресцентным красителем, денатурируется до одноцепочечного состояния и гибридизуется с расположенными на микрочипе локус-специфическими пробами. Обработка получаемых сигналов позволяет оценить, какие из участков генома представлены в избыточном количестве, а какие, наоборот, утрачены (рис. 3). Компаративная геномная гибридизация практически вытеснила традиционный цитогенетический анализ и стала стандартом медико-генетического обследования индивидуумов с подозрением на наследственное заболевание. Считается, что применение CGH может иметь заметные перспективы в клинической онкологии [21].

Широкую популярность получили т.н. полногеномные исследования полиморфных аллелей (genome-wide association studies, GWAS). Полиморфизмами называют

небольшие различия в нуклеотидной последовательности генов, обеспечивающие популяционную представленность одних и тех же локусов генома несколькими альтернативными вариантами. Наиболее известным проявлением генного полиморфизма является существование у человека различных рас. Генные полиморфизмы могут обуславливать разный уровень предрасположенности к тому или иному заболеванию, поэтому они являются предметом исключительно интенсивных исследований. Общее количество известных полиморфизмов приближается к 7 миллионам. К счастью, многие аллели характеризуются сцепленностью, поэтому генотипирование «всего» нескольких сотен тысяч однонуклеотидных вариаций (single nucleotide polymorphisms, SNPs) позволяет с высокой долей достоверности предсказать полиморфный статус всего генома. Полногеномные исследования ассоциаций проводятся на огромных коллекциях ДНК, включающих десятки тысяч онкологических больных и здоровых контролей [6, 17].

На рубеже прошедшего и нового десятилетий большую популярность получило т.н. полногеномное секвенирование (whole genome sequencing). Относительно доступной разновидностью этого метода является полноэкзомное секвенирование (whole exome sequencing), при котором анализ нуклеотидной последовательности ограничивается только кодирующими участками генома. Применение этой группы методов позволяет получить исчерпывающую информацию о наборе мутаций и генных полиморфизмов в каждом индивидуальном образце ДНК. Полногеномное секвенирование применяется как для анализа соматических мутаций в опухолевой ткани, так и для идентификации генных нарушений при наследственных заболеваниях. Использование высокопроизво-

длительного секвенирования нового поколения пока ограничивается единичными биологическими образцами – это связано как с высокой стоимостью соответствующих технологий, так и с некоторыми техническими ограничениями существующих методик. Тем не менее, именно полногеномное секвенирование имеет наилучшие шансы на скорейшее внедрение в повседневную клиническую практику – это связано как с безусловной ценностью информации, продуцируемой данным методом, так и с его стремительной адаптацией к требованиям учёных и врачей [20].

В отдельное направление исследований выделилась т.н. протеомика – наука, позволяющая осуществлять системный анализ клеточных белков [26]. Протеомика характеризуется значительно большей комплексностью по сравнению с молекулярной генетикой. Это связано с тем, что вопреки «школьным» представлениям, каждому гену соответствует не один белок, а десятки или даже сотни изоформ белкового продукта. В частности, каждый ген состоит из нескольких фрагментов кодирующих последовательностей – экзонов. Большую известность в биологии получил феномен альтернативного сплайсинга, подразумевающий что один и тот же ген может продуцировать десятки вариантов альтернативных РНК-транскриптов; эти транскрипты различаются между собой набором вошедших в состав матричной РНК экзонов, что в конечном счёте отражается на доменной композиции транслируемого белка. Например, если ген X состоит из 10 экзонов, то РНК-транскрипт может содержать как все 10 кодирующих фрагментов (1-2-3-4-5-6-7-8-9-10), так и меньшее число экзонных последовательностей (например, 3-4-5-6-7-8-9-10, или 1-2-3-4-5-6-7, или 4-5-6-7, или 1-2-5-6-7-10, или 3-7-9-10, и т.д.). Другим компонентом практически бесконечного многообразия белков является их способность к посттрансляционной модификации. В частности, некоторые тирозины, серины и треонины, входящие в аминокислотную последовательность белков, могут подвергаться фосфорилированию. Помимо этого, для белков также характерны гликозилирование и ацетилирование. Таким образом, примерно 25-30 тысячам генов человека соответствует несколько миллионов различных изоформ белков! Методы системного анализа белков характеризуются исключительной сложностью и подвергаются постоянному совершенствованию.

### Принципы обработки данных

Развитие автоматизированных методов получения молекулярно-генетической информации привело к удивительной ситуации: в настоящее время само накопление данных представляет значительно меньшую проблему, чем их обработка и хранение. Необходимость в анализе результатов «микрочиповых» исследований привело к появлению новой специальности, которая называется биоинформатикой.

Способ обработки молекулярно-генетических данных зависит от цели эксперимента. Первым направлением исследований подобного рода являются попытки выде-

лить новые разновидности (типы заболевания). В этом случае специальный компьютерный алгоритм автоматически классифицирует биобразцы по группам, характеризующимся схожестью измеряемых параметров. Наиболее известным исследованием этого рода является работа Perou et al. [16], в которой было выявлено существование люминального, HER2-опосредованного и базального вариантов рака молочной железы (РМЖ). К другой разновидности экспериментов относятся попытки выявить те или иные параметры, ассоциированные с особенностями течения заболевания. В этом случае биобразцы классифицируются по своей принадлежности к какой-либо клинико-биологической подгруппе, а среди молекулярно-генетических данных выявляют те показатели, которые в наибольшей степени ассоциируются с изучаемыми характеристиками патологического процесса. В рамках этого направления исследований идентифицируются биомаркеры, позволяющие предсказывать степень агрессивности опухоли, прогноз заболевания, ответ на ту или иную терапию, и т.д.

### Цели высокопроизводительного анализа биомолекул

Не вызывает ни малейшего сомнения, что «микрочиповые» технологии, будучи описательными по своей сути, принципиально увеличили возможности экспериментальной медицины. Многие области биологических исследований получили неопределимые инструменты для генерирования новых направлений, идей, гипотез. Представим, например, что мы изучаем процессы дифференцировки клеток в культуре. С появлением транскриптомного анализа появилась уникальная возможность сравнить экспрессионные профили дифференцированных и недифференцированных клеток; таким образом, всего один небольшой эксперимент позволяет сформировать список генов, представляющих интерес для дальнейшего изучения!

Применение тех же технологий для исследования клинического материала – опухолей – наталкивается на значительные затруднения. «Реальные» опухоли характеризуются огромной гетерогенностью, различаются между собой по содержанию и композиции стромальных элементов, возникают на фоне различных генетических, метаболических и внешних факторов, и т.д. и т.п. Таким образом, задача сопоставления получаемых данных оказывается несравнимо сложнее, чем анализ различных состояний одних и тех же клеток. Разнородность заболеваний и пациентов обычно пытаются компенсировать увеличением объёма исследуемых групп; предполагается, что подобный подход позволит произвести дискриминацию между значимыми и случайными молекулярно-генетическими событиями. Следует отметить, что применение высокопроизводительного анализа биомолекул позволило существенно углубить понимание фундаментальных механизмов возникновения рака.

Значительно сложнее обстоит дело с прикладными аспектами «микрочиповых» исследований. При форми-

ровании этого направления науки – 10-12 лет назад – практически все публикации обещали скорейший практический эффект от соответствующих разработок. Подобные заявления игнорируют тот факт, что истинная клиническая значимость теста предусматривает не только существенное изменение тактики лечения на основе получаемых данных, но и заметное улучшение результатов проводимых лечебных мероприятий. В качестве примера можно привести анализ статуса рецептора эстрогенов при операбельном раке молочной железы: проведение этого исследования позволяет не только снизить частоту послеоперационных рецидивов заболевания посредством назначения адъювантной эндокринотерапии пациенткам с рецептор-положительными опухолями, но и воздержаться от заведомо бесполезных воздействий на сигнальный каскад эстрогенов у женщин с рецептор-негативными карциномами. К сожалению, ни один из рекламируемых на сегодняшний день «микрочиповых» подходов пока не приблизился к уровню практической значимости, позволяющему поставить высокопроизводительный анализ биомолекул в один ряд с «устоявшимися» лабораторными методиками.

За прошедшее десятилетие практически все разновидности новообразований подверглись более или менее систематическому исследованию их молекулярных портретов. Тем не менее, практически все клинически-значимые достижения в этой сфере ограничиваются одной-единственной разновидностью карцином – раком молочной железы (РМЖ). Именно поэтому РМЖ является наиболее пригодным примером для обсуждения практических перспектив мультигенных тестов.

## **Рак молочной железы Молекулярная классификация РМЖ**

Наибольшую известность получила основополагающая работа Perou et al. [16], в которой результаты транскриптомного анализа были интерпретированы в пользу существования нескольких разновидностей рака молочной железы. В частности, был идентифицирован т.н. люминальный тип РМЖ, который характеризовался экспрессией маркеров люминального эпителия и рецепторов стероидных гормонов. Помимо этого, в виде отдельного класса выделялись HER2-опосредованные опухоли, примечательной особенностью которых представлялась активация сигнального каскада рецептора HER2. Исследование Perou et al. [16] напомнило об обсуждаемом с 1980-х гг. т.н. «базальном» типе РМЖ – разновидности опухолей, отличающихся негативным статусом рецепторов ER, PR и HER2 и экспрессией маркеров базального эпителия. И, наконец, был выделен т.н. «нормальный» тип РМЖ. Дальнейшие исследования подтвердили воспроизводимость предложенной классификации как минимум для трёх первых вариантов заболевания, в то время как существование «нормального» типа РМЖ было поставлено под сомнение [19]. Помимо этого, появились новые разновидности экспрессионных профилей РМЖ; например, в рамках люминального РМЖ было выделено не-

сколько подтипов [22, 29]. На основе перечисленных выше работ был создан коммерческий тест – PAM50 Breast Cancer Intrinsic Classifier (ARUP Laboratories, Salt Lake City, USA; <http://www.aruplab.com/guides/ug/tests/2004700.jsp>) – позволяющий использовать для классификации опухолей молочной железы архивный опухолевый материал. Что дали эти исследования практическому врачу?

Фактически, принципиально сходная классификация РМЖ существовала уже с начала 1990-х гг. В частности, люминальный тип А в целом соответствует тем опухолям, которые характеризуются высоким уровнем экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, отличаются относительно доброкачественным течением и хорошо отвечают на эндокринную терапию. При люминальном типе Б, в отличие от типа А, экспрессия рецепторов стероидных гормонов сочетается с высоким митотическим индексом. Карциномы HER2-опосредованного типа часто отличаются амплификацией и гиперэкспрессией онкогена HER2, высоким потенциалом метастазирования и плохим прогнозом заболевания. «Трижды-негативные» (базальные) РМЖ обладают высокой пролиферативной активностью, что обеспечивает выраженную чувствительность этой разновидности карцином к цитостатической терапии. В чём принципиальное отличие транскриптомной классификации от привычной иммуногистохимической диагностики РМЖ? В отличие от традиционного анализа, построенного на детекции отдельных молекул, транскриптомная классификация предоставляет информацию о состоянии сигнальных модулей в целом. Представим, что клетки РМЖ экспрессируют ER, но, по каким-либо причинам, этот рецептор не способен индуцировать внутриклеточную передачу сигналов, и, следовательно, не может вызывать экспрессию эстроген-зависимых генов. В этом случае результаты иммуногистохимического и транскриптомного анализов могут демонстрировать определенную дискордантность: в то время как морфолог отнесёт данную опухоль к рецептор-положительным (гормон-чувствительным) карциномам, молекулярное исследование, по-видимому, не подтвердит принадлежность данного РМЖ к люминальному типу.

Представим, что у нас имеется полная доступность не только иммуногистохимического, но транскриптомного анализа. Можно ли учитывать характеристики экспрессионного профиля при планировании лечения?! Нет!!! Если следовать здравому смыслу, то в упомянутом выше примере целесообразно отказаться от назначения эндокринотерапии, опираясь на вероятное отсутствие функциональной активности сигнального каскада эстрогенов. Существуют ли какие-либо клинические наблюдения, подтверждающие правомерность такого решения?! Нет!!! Таким образом, несмотря на то, что транскриптомный анализ обладает безусловным потенциалом выделять небольшие подгруппы опухолей, чьи биологические характеристики не в полной мере соответствуют результатам морфологического и иммуногистохимического исследований, эти возможности пока не могут быть транс-

лированы в изменение применяемых схем лечения. Следовательно, несмотря на перспективность транскриптомной классификации РМЖ, эта группа методов пока не имеет ощутимой клинической значимости.

### Прогностические маркеры РМЖ

Существует целый пласт исследований, направленных на анализ экспрессии генов в небольших операбельных опухолях молочной железы. Конечной целью подобных экспериментов является уточнение показаний к назначению или отказу от адъювантной терапии. Для многих тест-систем подобного рода предпринимаются интенсивные попытки их внедрения в повседневную клиническую практику.

### Oncotype DX

Oncotype DX (21-gene Recurrence Score assay; Genomic Health Inc., CA, USA; <http://www.oncotypedx.com/en-US/Breast/HealthcareProfessional/Guidelines.aspx>) является безусловным лидером по интенсивности своего маркетинга. В отличие от некоторых других тестов, он изначально основывался не столько на результатах «микрочиповых» исследований, сколько на анализе «кандидатных» генов. На первых этапах подготовки теста исследователи проанализировали экспрессию 250 генов, потенциальная прогностическая значимость которых основывалась на литературных данных. В качестве объекта исследования использовались ER-позитивные опухоли молочной железы, полученные от тех пациенток, которым была назначена адъювантная терапия тамоксифеном. Авторы сравнили экспрессионные профили у больных с благоприятным и неблагоприятным исходом подобного лечения, и разработали панель из 21 гена, которая позволяет предсказать исход заболевания. Эта панель включает 16 «генов-мишеней», ассоциированных с агрессивными характеристиками опухоли, и 5 «генов-рефери», используемых для калибровки уровня экспрессии. Тест выполняется в централизованных лабораториях с использованием специального набора реагентов, и предусматривает использование метода RT-PCR в режиме реального времени. По результатам теста больные классифицируются на 3 группы (с низким, промежуточным и высоким риском рецидива). Информацию, предоставляемую данным методом, рекомендуется использовать при решении вопроса о целесообразности дополнения эндокринотерапии адъювантной химиотерапией [1, 14].

### MammaPrint

MammaPrint (Agendia BV, Amsterdam, the Netherlands; <http://www.agendia.com/pages/mammaPrint/21.php>) является одним из первых прогностических тестов, разработанных для индивидуализации адъювантной терапии рака молочной железы [27, 28]. В основе теста лежит транскриптомное исследование пациенток с ранними стадиями рака молочной железы, которые наблюдались в течение нескольких лет после операции. В результате исследования выявлен паттерн (“gene signature”) из 70

генов, который позволяет предсказать вероятность рецидива РМЖ. Предполагается, что пациентки с плохим прогнозом нуждаются в назначении адъювантной химиотерапии, в то время как пациентки с благополучным экспрессионным профилем могут оставаться без лечения цитостатиками. В отличие от большинства других коммерческих тестов, для MammaPrint требуется использование свежемороженых опухолевых тканей. Существуют попытки адаптировать этот тест к методу RT-PCR, что позволит использовать в качестве источника РНК архивные биологические образцы [4].

### Mapquant

Mapquant (Genomic Grade Index; Ipsogen, Marseille, France and New Haven, USA; <http://www.ipsogen.com/en/molecularassays/breast-cancer/pro/>) представляет из себя тест-систему, направленную на уточнение степени злокачественности РМЖ [8, 23]. В его основе лежит сравнение транскриптомных портретов опухолей с низкой и высокой степенями злокачественности. Предполагается, что применение этого теста в случаях РМЖ с умеренной степенью злокачественности поможет принимать решение о назначении адъювантной химиотерапии или отказе от этого метода лечения. Как и в случае с MammaPrint, использование теста Mapquant требует доступности свежемороженых образцов РМЖ; в настоящее время разработчики теста готовят его новую версию, основанную на технологии RT-PCR.

### Theros Breast Cancer Index

Theros Breast Cancer Index (Biotheranostics, San Diego, USA; <http://biotheranostics.com/healthcare-professionals/hcp/bci/>) разрабатывался на пациентках с первой стадией ER-позитивного РМЖ, которые получали терапию тамоксифеном. В 2004 г. Ma et al. [9] продемонстрировали, что соотношение экспрессии всего двух генов (HOXB13 / IL17BR) позволяет с высокой достоверностью предсказать риск рецидива. В дальнейшем этот тест был дополнен ещё 5 генами (BUB1B, CENPA, NEK2, RACGAP1, RRM2), которые помогают уточнить степень злокачественности опухоли [10].

### Взаимосвязь инновационных и традиционных прогностических маркеров рака молочной железы

Перспективность представленных выше диагностических подходов отрицают только самые отъявленные ретрограды. Тем не менее, вопрос о немедленном и широкомасштабном клиническом использовании предлагаемых коммерческих тестов вызывает жаркие дебаты.

Большинство скептиков справедливо отмечают, что практически все исследования, лежавшие в основе разработки мультигенных прогностических тестов, проигнорировали необходимость статистической поправки на статус традиционных прогностических параметров (уровень экспрессии гормональных рецепторов, степень дифференцировки опухоли, количество митозов, пролиферативный индекс Ki-67 и т.д. и т.п.) [19].

Это замечание представляется абсолютно справедливым, но оно оставляет за рамками дискуссии другой чрезвычайно болезненный аспект диагностики РМЖ, а именно плохую воспроизводимость тестирования «традиционных» маркеров РМЖ. Даже столь стандартизованная процедура, как определение уровня рецепторов эстрогенов, наталкивается на значительные трудности [5]. Ещё хуже обстоит дело с определением степени злокачественности опухоли – по мнению большинства специалистов, эта методика отличается исключительной степенью субъективизма [18]. Энтузиасты инновационных методов любят указывать на неоспоримое преимущество мультигенных тестов – на их хорошую воспроизводимость; следует прокомментировать, что молекулярный анализ, в отличие от морфологических и иммуногистохимических исследований, преимущественно осуществляется в централизованных лабораториях [15].

Другим интересным аспектом дебатов представляется тот факт, что разработанные в ходе транскриптомного анализа панели прогностических генов практически не перекрываются между собой. Скептики расценивают этот результат как признак низкой информативности данных, получаемых в ходе «микрочиповых» исследований. Их оппоненты указывают на то, что практически все прогностически-значимые гены в той или иной мере отвечают за пролиферацию клеток; т.к. гены пролиферации действуют не поодиночке, а кластерами, каждый из участников подобного кластера может выступать в роли маркера пролиферативной активности [23].

Вероятно, наиболее оправданным местом применения мультигенных панелей являются те редкие случаи РМЖ, клинические характеристики которых не поддаются однозначной интерпретации. Например, к этой категории принадлежат небольшие ER-позитивные HER2-негативные опухоли, которые не сопровождаются вовлечением лимфатических узлов и имеют умеренную степень злокачественности [7].

### Другие разновидности опухолей

Уровень разработки прогностических предиктивных тестов для других разновидностей опухолей заметно отстаёт от такового в отношении РМЖ. В рамках исследований упоминавшейся выше компании Genomic Health Inc., CA, USA разработан 12-генный

ПЦР-тест, позволяющий прогнозировать вероятность рецидива рака толстой кишки, подвергшегося оперативному лечению на второй стадии заболевания (<http://www.oncotypedx.com/en-US/Colon/Healthcare-Professional/Overview.aspx>). Изучение других разновидностей опухолей, направленное на идентификацию клинически значимых прогностических генных профилей, пока не принесло желаемого результата [3, 25].

Интересным направлением экспериментов с биологическими микрочипами являются попытки разработать панели для гистологической и/или органной идентификации опухолей с неизвестным первичным очагом. Идея подобных исследований сводится к использованию панели тканеспецифических маркеров. Главное ограничение работ в этой области – невозможность достоверно проверить адекватность результатов, получаемых тем или иным методом [12]. В настоящее время в распоряжении онкологов уже имеются коммерческие наборы, разработанные для подобных целей (например, CancerType; Biotheranostics, San Diego, USA; <http://biotheranostics.com/healthcare-professionals/hcp/ctid/>). Ожидается, что большим потенциалом для диагностики опухолей неизвестной локализации обладает анализ микроРНК [11].

### Заключение

За прошедшее десятилетие был разработан целый ряд мультигенных молекулярных тестов, направленных на совершенствование диагностики и лечения онкологических заболеваний. Перспективность маркеров этого класса не вызывает никаких сомнений. Применение «микрочиповых» тестов ограничивается не только экономическими соображениями, но и неопределённостью конкретных клинических показаний к их использованию. Предполагается, что тесное взаимодействие специалистов по клинической онкологии, молекулярной генетике и биостатистике позволит ускорить внедрение методов высокопроизводительной молекулярной диагностики в повседневную клиническую практику.

### Благодарности

Данная работа выполнена при поддержке грантов Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 02.740.11.0780) и Правительства Москвы (№ 15/11-Ген-М).

### Литература

1. Baebner FL, Lee M, Demeure MJ, Bussey KJ, Kiefer JA, Barrett MT. Genomic signatures of cancer: basis for individualized risk assessment, selective staging and therapy. *J Surg Oncol*, 2011, 103, 563-73.
2. Broadhead ML, Clark JC, Dass CR, Choong PF. Microarray: an instrument for cancer surgeons of the future? *ANZ J Surg*, 2010, 80, 531-6.
3. Chon HS, Lancaster JM. Microarray-based gene expression studies in ovarian cancer. *Cancer Control*, 2011, 18, 8-15.
4. Espinosa E, Vara JA, Redondo A, Sánchez JJ, Hardisson D, Zamora P, Pastrana FG, Cejas P, Martínez B, Suárez A, Calero F, Baryn MG. Breast cancer prognosis determined by gene expression profiling: a quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction study // *J. Clin. Oncol.* – 2005. – Vol.23. – P.7278-7285.

5. Hammond ME., Hayes DF., Dowsett M., Allred D.C., Hagerty K.L., Badve S., Fitzgibbons P.L., Francis G., Goldstein N.S., Hayes M., Hicks D.G., Lester S., Love R., Mangu P.B., McShane L., Miller K., Osborne C.K., Paik S., Perlmutter J., Rhodes A., Sasano H., Schwartz J.N., Sweep F.C., Taube S., Torlakovic E.E., Valenstein P., Viale G., Visscher D., Wheeler T., Williams R.B., Wittliff J.L., Wolff A.C. American Society of Clinical Oncology/College Of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer // J. Clin. Oncol. – 2010. – Vol.28. – P.2784-2795.

6. Hartman M., Loy E.Y., Ku C.S., Chia K.S. Molecular epidemiology and its current clinical use in cancer management // Lancet. Oncol. – 2010. – Vol.11. – P.383-390.

7. Kaufmann M., Puzstai L. Biedenkopf Expert Panel Members. Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: Consensus recommendations from an International Expert Panel // Cancer. – 2011. – Vol.117. – P.1575-1582.

8. Loi S., Haibe-Kains B., Desmedt C., Lallemand F., Tutt A.M., Gillet C., Ellis P., Harris A., Bergh J., Foekens J.A., Klijn J.G., Larsimont D., Buyse M., Bontempi G., Delorenzi M., Piccart M.J., Sotiriou C. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade // J. Clin. Oncol. – 2007. – Vol.25. – P.1239-1246.

9. Ma X.J., Wang Z., Ryan P.D., Isakoff S.J., Barmettler A., Fuller A., Muir B., Mohapatra G., Salunga R., Tuggle J.T., Tran Y., Tran D., Tassin A., Amon P., Wang W., Wang W., Enright E., Stecker K., Estepa-Sabal E., Smith B., Younger J., Balis U., Michaelson J., Bhan A., Habin K., Baer T.M., Brugge J., Haber D.A., Erlander M.G., Sgroi D.C. A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen // Cancer Cell. – 2004. – Vol.5. – P.607-616.

10. Ma X.J., Salunga R., Dabiya S., Wang W., Carney E., Durbecq V., Harris A., Goss P., Sotiriou C., Erlander M., Sgroi D. A five-gene molecular grade index and HOXB13:IL17BR are complementary prognostic factors in early stage breast cancer // Clin. Cancer Res. – 2008. – Vol.14. – P.2601-2608.

11. Munker R., Calin G.A. MicroRNA profiling in cancer // Clin. Sci (Lond). – 2011. – Vol.121. – P.141-158.

12. Natoli C., Ramazzotti V., Nappi O., Giacomini P., Palmeri S., Salvatore M., Landriscina M., Zilli M., Natali P.G., Tinari N., Iacobelli S. Unknown primary tumors // Biochim Biophys Acta. – 2011. – Vol.1816. – P.13-24.

13. O'Toole S.A., Selinger C.I., Millar E.K., Lum T., Beith J.M. Molecular assays in breast cancer pathology // Pathology. – 2011. – Vol.43. – P.116-127.

14. Paik S., Shak S., Tang G., Kim C., Baker J., Cronin M., Baehner F.L., Walker M.G., Watson D., Park T., Hiller W., Fisher E.R., Wickerham D.L., Bryant J., Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer // N. Engl. J. Med. – 2004. – Vol.351. – P.2817-2826.

15. Paik S. Is gene array testing to be considered routine now? // Breast. – 2011. – Vol.20(Suppl.3). – P.87-91.

16. Perou C.M., Sørlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Burresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours // Nature. – 2000. – Vol.406. – P.747-752.

17. Pharoah P.D., Antoniou A.C., Easton D.F., Ponder B.A. Polygenes, risk prediction, and targeted prevention of breast cancer // N. Engl. J. Med. – 2008. – Vol.358. – P.2796-2803.

18. Rakha EA., Reis-Filho J.S., Baehner F., Dabbs D.J., Decker T., Eusebi V., Fox S.B., Ichihara S., Jacquemier J., Lakbani S.R., Palacios J., Richardson A.L., Schmitt S.J., Schmitt F.C., Tan P.H., Tse G.M., Badve S., Ellis I.O. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade // Breast Cancer Res. – 2010. – Vol.12. – P.207.

19. Rakha EA., Ellis I.O. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics // Adv. Anat. Pathol. – 2011. – Vol.18. – P. – 255-267.

20. Ross J.S., Cronin M. Whole cancer genome sequencing by next-generation methods // Am. J. Clin. Pathol. – 2011. – Vol.136. – P.527-539.

21. Sara H., Kallioniemi O., Nees M. A decade of cancer gene profiling: from molecular portraits to molecular function // Methods Mol Biol. – 2010. – Vol.576. – P.61-87.

22. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J.S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C.M., Lønning P.E., Brown P.O., Burresen-Dale A.L., Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets // Proc. Natl. Acad. Sci USA. – 2003. – Vol.100. – P. 8418-8423.

23. Sotiriou C., Wirapati P., Loi S., Harris A., Fox S., Smeds J., Nordgren H., Farmer P., Praz V., Haibe-Kains B., Desmedt C., Larsimont D., Cardoso F., Peterse H., Nuyten D., Buyse M., Van de Vijver M.J., Bergh J., Piccart M., Delorenzi M. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis // J. Natl. Cancer Inst. – 2006. – Vol.98. – P.262-272.

24. Sotiriou C., Puzstai L. Gene-expression signatures in breast cancer // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol.360. – P.790-800.

25. Subramanian J., Simon R. Gene expression-based prognostic signatures in lung cancer: ready for clinical use? // J. Natl. Cancer Inst. – 2010. – Vol.102. – P.464-474.

26. Tortoise A., De Pauw E., Castronovo V. Innovative proteomics for the discovery of systemically accessible cancer biomarkers suitable for imaging and targeted therapies // Amer. J. Pathol. – 2011. – Vol.178. – P.12-18.

27. van de Vijver M.J., He Y.D., van't Veer L.J., Dai H., Hart A.A., Voskuil D.W., Schreiber G.J., Peterse J.L., Roberts C., Marton M.J., Parrish M., Atsma D., Witteveen A., Glas A., Delabaye L., van der Velde T., Bartelink H., Rodenhuis S., Rutgers E.T., Friend S.H.,



*Bernards R.* A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer // *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol.347. – P.1999-2009.

28. *van 't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M., Peterse H.L., van der Kooy K., Marton M.J., Witteveen A.T., Schreiber G.J., Kerkhoven R.M., Roberts C., Linsley P.S., Bernards R., Friend S.H.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer // *Nature.* – 2002. – Vol.415. – P.530-536.

29. *Weigelt B., Baehner F.L., Reis-Filho J.S.* The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade // *J. Pathol.* – 2010. – Vol.220. – P.263-280.