

Повышение точности и информативности тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии опухолей молочной железы путем анализа микроРНК в материале цитологического мазка

Н.Н. Колесников¹, С.Е. Титов^{1,2}, Ю.А. Веряскина¹, А.В. Владимирова³, Р.Б. Самсонов^{3,4},
А.С. Артемьева³, В.И. Новик³, Л.М. Берштейн³, И.Ф. Жимулев¹, А.В. Малек^{3,4}

¹ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения РАН;
Россия, 630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8/2;

²ЗАО «Вектор-Бест»; Россия, 630117, Новосибирск-117;

³ФГБУ «Научно-исследовательский институт онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России;
Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

⁴ООО «Онкосистема»; Россия, 194356, Санкт-Петербург, ул. Хошимина, 11

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

Актуальность. Рак молочной железы — самое распространенное злокачественное новообразование у женщин. Биопсия ткани опухоли молочной железы является ключевым этапом диагностики, позволяющим оценить природу новообразования и определить тактику лечения. В клинической практике применяются методы трепан-биопсии и тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ). Последний вариант менее травматичен, но используется реже по причине меньшей информативности. Кроме того, при любом из двух методов существует риск забора малоинформативного образца, а точность диагноза определяется квалификацией гистолога/цитолога. Возможность использовать биопсийный материал для анализа онкомаркеров в дополнение к стандартному исследованию открывает перспективы существенного повышения информативности и объективности традиционных подходов, включая метод ТАПБ. Среди потенциальных онкомаркеров особое место занимают микроРНК (миРНК) — класс регуляторных молекул, играющих важную роль в различных физиологических и патологических процессах. Неопластическая трансформация протокового эпителия молочных желез сопровождается специфическими изменениями профиля экспрессии миРНК. Оценка этих изменений имеет большой диагностический потенциал.

Цель исследования — разработка и оценка перспективы внедрения в клиническую практику метода анализа миРНК в материале цитологических препаратов.

Материалы и методы. В исследовании использованы архивные цитологические препараты, по которым ранее был установлен диагноз доброкачественной или злокачественной опухоли молочной железы. Оценка экспрессии миРНК проводили методом обратной транскрипции и последующей количественной полимеразной цепной реакции. При анализе результатов были использованы соответствующие данные ранее проведенных цитологических и гистологических исследований.

Результаты. Разработан метод выделения РНК из препаратов, приготовленных для традиционного цитологического исследования. Проведен анализ экспрессии 9 миРНК. Сравнение результатов анализа материала доброкачественных и злокачественных образований показало статистически значимую разницу экспрессии 5 миРНК: миРНК-21, -205, -125b, -200a и -221. Наиболее значимую разницу наблюдали для миРНК-125b: в ходе неопластической трансформации уровень экспрессии этой молекулы снижается в 500 раз. Установлена корреляция экспрессии некоторых миРНК с рядом клинически значимых характеристик опухолевой ткани.

Заключение. Результаты работы показали возможность оценки экспрессии миРНК в материале ТАПБ образований молочной железы и целесообразность ее использования в дополнение к традиционному цитологическому исследованию в целях уточнения диагноза и оптимизации выбора терапии.

Ключевые слова: рак молочной железы, диагностика, тонкоигольная аспирационная пункционная биопсия, микроРНК, миРНК-125b

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-44-52

Improvement of accuracy and diagnostic significance of breast tumor fine-needle aspiration biopsy by miRNA analysis of material isolated from cytological smears

N.N. Kolesnikov¹, S.E. Titov^{1,2}, Yu.A. Varyaskina¹, A.V. Vladimirova³, R.B. Samsonov^{3,4},
A.S. Artem'eva³, V.I. Novik³, L.M. Bershteyn³, I.F. Zhimulev¹, A.V. Malek^{3,4}

¹Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences;
8/2 Acad. Lavrentyeva prospekt, Novosibirsk, 630090, Russia;

²ZAO "West-Best"; Novosibirsk-117, 630117, Russia;

³N.N. Petrov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia;
68 Leningradskaya St., Pesochnyi Settlement, Saint Petersburg, 197758, Russia;

⁴ООО "Onkosistema"; 11 Khoshimina St., Saint Petersburg, 194356, Russia

Relevance. Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women. Tumor biopsy, a key diagnostic approach, is required to evaluate the nature of tumor and to determine the therapeutic strategy. In clinical practice methods are being applied: trepan-biopsy and fine needle aspiration biopsy (FNAB). The latter is less traumatic however is used less often because it provides with less information. Moreover, dependence from quality of biopsy and qualification of morphologist are attributes of both techniques. A possibility to use biopsy material for farther analysis of tumor-markers would open a perspective to obtain more information and to improve objectivity of traditional diagnostic approaches, including FNAB. MicroRNAs (miRNAs), regulatory molecules involved in control of virtually all physiologic and pathologic process, emerged as promising tumor markers. Malignant transformation of mammary gland epithelia is associated with specific alterations of cellular miRNAs profile. Analysis of these alterations is of great diagnostic potency.

Objective. Development of method for miRNAs analysis in cytological smears material and evaluation of its practical applicability.

Material and methods. Archived cytological material (smears on the glass slides) from patients with benign tumor and breast cancer was used. Analysis of miRNAs expression was performed by reverse transcription followed by quantitative PCR. Results of reverse transcription polymerase chain reaction were analyzed with use of relevant cytological and morphological data.

Results. Method of miRNAs analysis in material of cytological smears was developed. Expression of 9 miRNAs in 80 samples was evaluated. Statistically significant expression difference between benign and malignant tumor samples was found for 5 miRNAs: miR-21, miR-205, miR-125b, miR-200a, miR-221. MiR-125b exhibited most prominent expression dysregulation: malignant transformation of mammary epithelium is associated with 500 fold decrease of miR-125b expression level. Expression alterations of several miRNAs were revealed to correlate with clinically relevant characteristics of tumors.

Conclusions. Results of our study indicated the possibility of miRNAs expression analysis in the FNAB material and the applicability of this method as additive approach to the convention cytological examination. Application of this method will allow to specify diagnosis and to optimize choice of the therapeutic strategy.

Key words: breast cancer, diagnostics, fine needle aspiration biopsy, microRNA, miR-125b

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — самое распространенное злокачественное новообразование у женщин. В 2012 г. заболеваемость и смертность от РМЖ в России составили 46,17 и 15,94 случая на 100 тыс. женщин соответственно [1]. Это означает, что каждый год в нашей стране около 60 тыс. женщин заболевают и более 22 тыс. погибают от РМЖ. Эффективность лечения во многом определяется стадией впервые выявленного заболевания. Пятилетняя выживаемость при I и II стадиях составляет 93–100 %, в то время как при III и IV стадиях — лишь 72 и 22 % соответственно. В нашей стране диагноз РМЖ в 65 % случаев устанавливается на I и II стадиях заболевания, в 25 % — на III, и в 10 % — на IV [1]. Эта статистика отчетливо показывает необходимость разработки новых эффективных и доступных методов ранней диагностики РМЖ.

В настоящее время нет надежных молекулярных маркеров, которые позволяли бы проводить скрининговые исследования в целях выявления пациенток с начальными формами РМЖ. Молекулярно-генетические исследования имеют в основном прогностическое значение и не могут серьезно улучшить диагностические показатели заболевания, которое в 90–95 % случаев носит спорадический (ненаследственный) характер. Основными методами ранней диагностики остаются пальпаторное исследование и скрининговые инструментальные методы (ультразвуковое исследование, маммография). Следующим шагом после обнаружения образования в ткани молочной железы в ходе пальпаторного или инструментального исследования является биопсия. Материал из образования может быть получен путем трепан-биопсии или тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии (ТАПБ). Последний метод существенно менее травматичен

и болезненен. В течение многих лет в литературе обсуждается вопрос о возможности диссеминации клеток опухоли в результате трепан-биопсии, что является дополнительным аргументом в пользу ТАПБ [2]. Кроме того, по сравнению с трепан-биопсией и подготовкой гистологического препарата процедура забора материала проще, а приготовление препарата быстрее и дешевле в случае ТАПБ с последующим цитологическим исследованием. Несмотря на это, в современных клинических условиях трепан-биопсия выполняется чаще, так как она позволяет провести гистологическое и иммуногистохимическое исследования и получить клинически важную информацию, определяющую лечебную тактику. Цитологическое исследование дает существенно меньше информации и выполняется реже.

Открытие молекул-ингибиторов синтеза белков на посттранскрипционном уровне — микроРНК (миРНК) — предоставило новые возможности поиска тканевых онкомаркеров и анализа биопсийного материала [3, 4]. МиРНК играют существенную роль в процессе развития онкологических заболеваний, включая РМЖ, являясь непосредственными участниками процесса канцерогенеза и выполняя роль онкосупрессоров или онкогенов, через взаимодействие с соответствующими генами-мишенями [5]. Поскольку процесс неопластической трансформации протокового эпителия сопровождается специфическими изменениями профиля экспрессии миРНК, очевиден большой диагностический потенциал анализа миРНК в ткани опухоли [6, 7]. Например, показано, что специфические особенности профиля экспрессии миРНК позволяют дифференцировать различные молекулярно-генетические типы РМЖ [8, 9]. Особенности профиля экспрессии миРНК отличают трижды негативный тип (TNBC) РМЖ, что может найти применение в прогнозировании течения

заболевания [10], ответа на неоадьювантную терапию [11] и последующем развитии лекарственной резистентности [12]. Ввиду того, что миРНК регулируют миграционные и адгезивные характеристики опухолевых клеток, закономерна связь между профилем миРНК и метастатическим потенциалом опухоли или прогнозом заболевания [13]. Поэтому в течение последних нескольких лет ведется активная работа по созданию и оптимизации методов выделения и анализа миРНК в образцах опухолевой ткани, включая парафиновые блоки [14], материал трепан-биопсий [15], операционный материал [9].

С учетом малой инвазивности ТАПБ, большого потенциала расширения ее использования, относительной простоты выполнения представляется целесообразной разработка метода выделения и анализа миРНК из материала препаратов, приготовленных для цитологического исследования образований молочной железы. Важным с практической точки зрения является тот факт, что использование цитологических препаратов позволяет избежать дополнительных хирургических манипуляций и применять метод после или в дополнение к обычному цитологическому исследованию в случае необходимости уточнения диагноза. В перспективе после валидации метода и разработки четких алгоритмов интерпретации полученных данных анализ миРНК в материале цитологических препаратов поможет расширить показания к применению ТАПБ, которая является простым и доступным методом верификации диагноза РМЖ.

Основная цель исследования — оценка перспективы внедрения в клиническую практику метода анализа миРНК в материале цитологических препаратов. Достижение поставленной цели потребовало решения следующих задач:

- разработка метода выделения РНК из биопсийного материала цитологических препаратов;
- анализ профиля экспрессии миРНК, ассоциированных с РМЖ, в выделенном материале;
- сравнение уровня экспрессии выбранных миРНК в препаратах злокачественных (РМЖ) и доброкачественных (фиброаденома) образований молочной железы;
- анализ полученных экспрессионных данных в контексте результатов последующих гистологических исследований.

Материалы и методы

Материал. В исследовании использовали архивный материал от 80 пациенток, проходивших амбулаторное обследование в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова в период 2013–2014 гг. в целях оценки природы новообразований молочной железы. Использование материала было одобрено этическим комитетом НИИ онкологии, все данные деперсонализированы. В исследование включены образцы материала, полученного для цитологического исследования в результате

ТАПБ ($n = 73$), мазки-отпечатки операционного материала ($n = 3$), отпечатки трепан-биоптатов ($n = 4$).

Для получения цитологического препарата проводили стандартную обработку стекол: мазок высушивали на воздухе, материал фиксировали 95 % этанолом 10 мин и окрашивали гематоксилин-эозином. Цитологическое исследование проводили с помощью световой микроскопии, по результатам которой в 51 случае была диагностирована карцинома, в 29 случаях — установлена доброкачественная природа образования (фиброаденома, пролиферация эпителия без атипии). Диагноз злокачественного образования во всех случаях подтвержден гистологически в ходе дальнейшего обследования.

Выделение РНК. Выделение суммарного пула РНК проводили с помощью набора «РеалБест экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали на спектрофотометре NanoDrop 2000C (Thermo Scientific, США). Концентрация выделенной РНК была в диапазоне от 17,5 до 463,0 нг/мкл. Количество РНК, выделенной из материала цитологического препарата, было достаточным для анализа уровня экспрессии миРНК. Чистоту препарата оценивали как отношение поглощения при длинах волн 260/280 нм и 260/230 нм. Препараты РНК считали годными для анализа при показателях абсорбции $A_{260/280} - 2,8$, $A_{260/230} - 1,8-2,2$, которые свидетельствуют о достаточной чистоте препарата.

Обратная транскрипция — количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) для получения кДНК проводили в объеме 30 мкл. Использовали готовые реакционные смеси «РеалБест Мастер микс ОТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Реакцию выполняли в течение 30 мин при температуре $+42^{\circ}\text{C}$, после чего реакционную смесь инкубировали 2 мин при $+95^{\circ}\text{C}$ для инактивации обратной транскриптазы. Полученную реакционную смесь, содержащую кДНК, сразу использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Измерение уровней экспрессии миРНК выполняли методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве референсного гена использовали малую ядерную РНК (яРНК) U6. Реакцию ПЦР проводили в объеме 30 мкл с применением готовой реакционной смеси «РеалБест Мастер микс» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) и раствора прямого и обратного праймеров (5,0 мкМ) и зонда (2,5 мкМ). Протокол реакции ПЦР: предварительный прогрев при температуре $+94^{\circ}\text{C} - 2$ мин, 50 основных циклов денатурации при $+94^{\circ}\text{C} - 10$ с, отжига и элонгации при $+60^{\circ}\text{C} - 20$ с.

Анализ данных. Уровень экспрессии миРНК оценивали относительно уровня экспрессии малой яРНК U6, вычисляли по формуле $2^{(Ct\ U6 - Ct\ miR\ of\ interest)}$ и обозначали как ΔCt . Статистическую обработку проводили с применением непараметрического U-критерия

Манна–Уитни в программе Statistica 10.0. Чтобы оценить значимость выявленных различий, проводили математическую обработку методом построения ROC-кривой с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 21.

Результаты

Различия профиля экспрессии микроРНК в цитологических препаратах злокачественных и доброкачественных образований молочной железы. Цитологический анализ клеточного материала пункционной биопсии направлен на установление характера образования и его доброкачественной или злокачественной природы. Это главный вопрос, который волнует при обследовании и пациентов, и лечащих врачей. Цитологи выносят решение на основе анализа морфологических признаков и особенностей исследуемых клеток. Дополнительная молекулярно-генетическая информация может быть полезна в сомнительных случаях. Поскольку микроРНК — непосредственные участники процессов канцерогенеза, главной задачей является установление различий в спектре экспрессии микроРНК между доброкачественными и злокачественными образованиями. Выбор микроРНК, включенных в исследование, был сделан на основе анализа собственных данных [4] и данных литературы (табл. 1). Сравнительный анализ 9 маркерных микроРНК в препаратах РМЖ ($n = 51$) и доброкачественных образований ($n = 29$) выявил различия как в сторону повышения (микроРНК-21, микроРНК-155, микроРНК-20a, микроРНК-146b, микроРНК-200a), так и по-

нижения (микроРНК-221, микроРНК-205 и микроРНК-125b) уровней их экспрессии в опухолевых клетках. Статистически значимая разница установлена для 5 микроРНК: микроРНК-21, микроРНК-221, микроРНК-200a, микроРНК-205 и микроРНК-125b (см. табл. 1, рис. 1). Наиболее существенную разницу (понижение экспрессии в 500 раз) наблюдали для онкосупрессорной микроРНК-125b. Диагностическая значимость анализа этой микроРНК была оценена с помощью ROC-анализа (рис. 2), который показал, что микроРНК-125b может быть использована в качестве классификатора в ходе дифференциальной диагностики РМЖ и доброкачественных новообразований (площадь под кривой составила 0,86). Таким образом, мы продемонстрировали возможность экстракции РНК из материала цитологических препаратов, полученных после ТАПБ, и выявили различия в спектрах экспрессии микроРНК между злокачественными и доброкачественными новообразованиями молочной железы.

Алгоритм анализа профиля экспрессии микроРНК для уточнения цитологического диагноза. В клинической практике приобретает все большее значение разработка алгоритмов интерпретации результатов анализа индивидуальных профилей микроРНК. Как было показано, существенное и достоверно значимое снижение уровня экспрессии микроРНК-125b может являться критерием диагноза РМЖ, и микроРНК-125b может рассматриваться в качестве классификатора. С учетом проведенных исследований были рассчитаны основные показатели диагностической значимости такого анализа: чувствительность — 0,9, специфичность — 0,54, прогностическая ценность положительного результата (positive predictive value, PPV) — 0,78, прогностическая ценность отрицательного результата (negative predictive value, NPV) — 0,75. Специфичность диагностического метода может быть повышена путем введения дополнительных критериев — показателей экспрессии других маркерных микроРНК. Нами разработан алгоритм интерпретации данных анализа 4 микроРНК: 2 онкогенных (микроРНК-21, микроРНК-200a) и 2 онкосупрессорных (микроРНК-125, микроРНК-205). Расчет уровня экспрессии проводили относительно малой яРНК U6. При этом значение ΔCt микроРНК-125b < 1 считали основным диагностическим критерием и оценивали в 3 балла, значения ΔCt микроРНК-205 $< 3,5$; ΔCt микроРНК-21 > 20 и ΔCt микроРНК-200a $> 0,035$ считали дополнительными критериями и оценивали в 1 балл. Диагноз РМЖ устанавливали в том случае, если результаты ПЦР-анализа удовлетворяли основному и одному из трех дополнительных критериев, т. е. сумма баллов составляла ≥ 4 . Согласно такому алгоритму мы оптимизировали диагностические показатели метода: чувствительность — 0,88, специфичность — 0,61, PPV — 0,8, NPV — 0,74. На рис. 3 представлен пример анализа 3 образцов (№ 8, 14 и 61). Цитологическая диагностика первых 2 не вызвала затруднений, и результаты последующего анализа микроРНК подтвердили диагноз, установленный цитологами. Цитологическая картина

Таблица 1. МикроРНК, включенные в исследование, и результаты сравнительного анализа их экспрессии в смывах цитологических препаратов злокачественных (РМЖ) и доброкачественных (фиброаденома) образований

микроРНК	Ссылка	Характер и уровень изменения экспрессии микроРНК
микроРНК-21	[20]	↑: 2,5 (***)
микроРНК-221	[21]	↓: 0,5 (**)
микроРНК-222	[22]	1
микроРНК-155	[23]	↑: 1,2 (ns)
микроРНК-20a	[24]	↑: 1,8 (ns)
микроРНК-146b	[17]	↑: 1,2 (ns)
микроРНК-200a	[25]	↑: 2,2 (***)
микроРНК-205	[26]	↓: 0,4 (***)
микроРНК-125b	[18]	↓: 0,002 (***)

Примечание. Информация по каждой микроРНК включает характер изменения уровня экспрессии в клетках РМЖ относительно клеток фиброаденомы (↑ — повышение, ↓ — понижение); порядок изменения и статистическую значимость, определенную по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,5$ (*); $p < 0,05$ (**); $p < 0,005$ (***) ; $p < 0,0005$ (****); ns — наблюдаемые изменения не являются статистически значимыми.

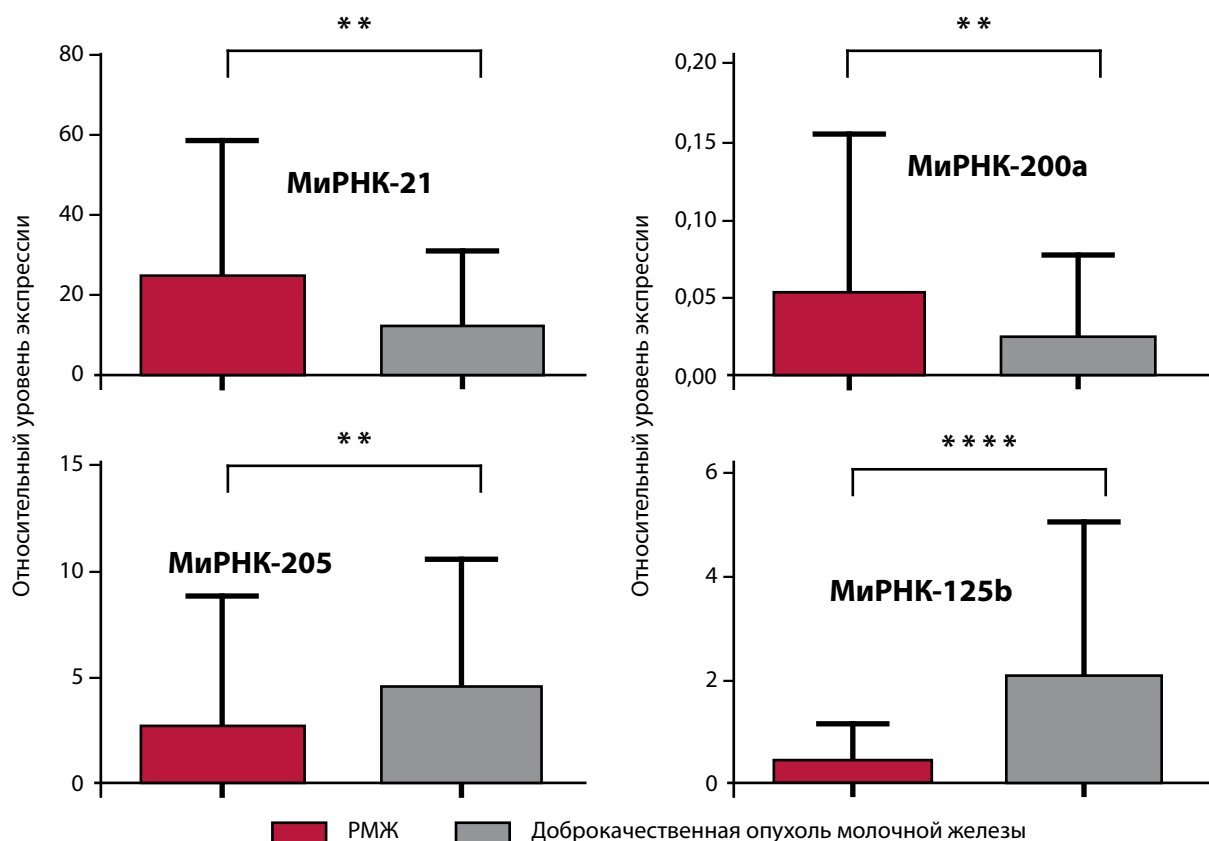


Рис. 1. Различия уровней экспрессии миРНК (медиана; 0,75 квантиль), оцененные в материале цитологических препаратов РМЖ и доброкачественных опухолей (фиброаденома). Результаты рассчитаны относительно уровня экспрессии яРНК U6 ($2^{(Ct\ U6 - Ct\ miR\ of\ interest)}$); стандартные отклонения получены для 51 образца РМЖ и 29 образцов фиброаденомы; статистическая значимость определена по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,05$ (**); $p < 0,0005$ (****)

3-го препарата не была характерна для фиброаденомы, и установление диагноза в данном клиническом случае являлось нетривиальной задачей. Анализ 4 миРНК в материале препарата и оценка результатов с помощью предложенного алгоритма позволили определить природу образования и подтвердить диагноз фиброаденомы.

Корреляции профиля экспрессии микроРНК, определенного в материале цитологического мазка, с клинически значимыми характеристиками РМЖ. Анализ профиля экспрессии миРНК в материале цитологического мазка может быть использован не только для уточнения диагноза и оптимизации процесса диагностики. Особый интерес представляет возможность получения дополнительной информации, источником которой в настоящее время являются данные гистологического или молекулярно-генетического исследования, что требует проведения как минимум трепан-биопсии. Для оценки такой возможности был проведен анализ полученных результатов (профиль экспрессии 9 миРНК в 51 образце РМЖ) в контексте имеющихся данных гистологических исследований материала трепан-биопсий или операционного материала. Результаты анализа представлены в табл. 2 и на рис. 4. Так, уровни экспрессии миРНК-221 и миРНК-146b статистически

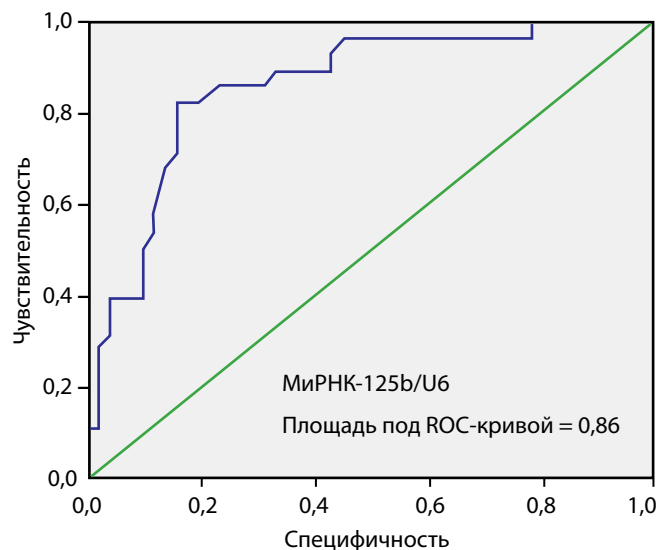
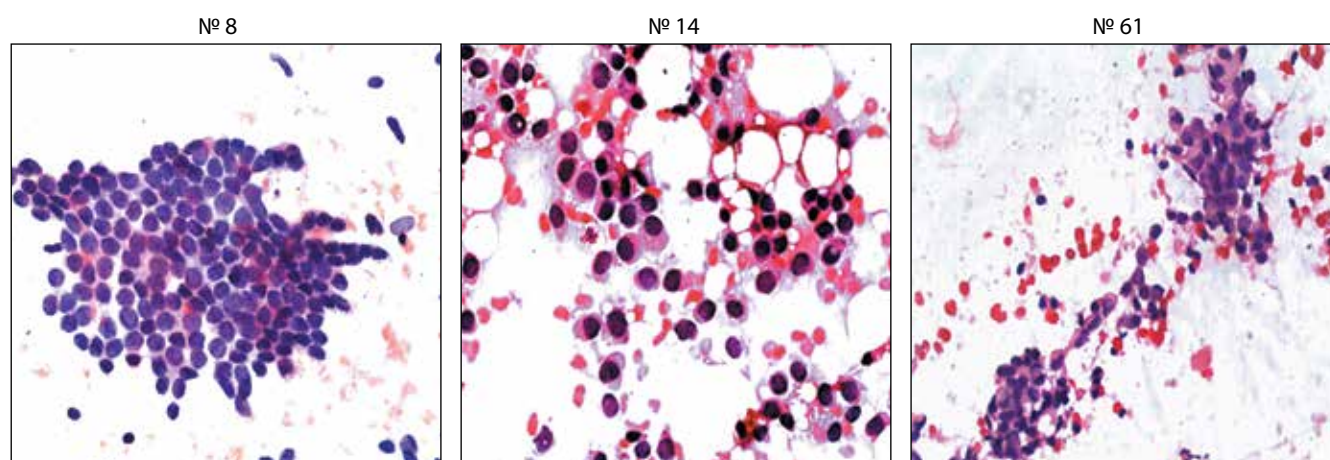


Рис. 2. Оценка диагностической значимости анализа миРНК-125b в материале цитологических препаратов с помощью построения ROC-кривой

значимо повышаются при увеличении значения гистологического критерия G, т. е. при снижении степени дифференцировки опухоли. Повышение уровня экспрессии маркера пролиферативной активности — ядерного антигена Ki-67 — коррелирует со снижением



Номер образца	Результат анализа, баллы				Сумма баллов	Диагноз
	миРНК-125b, $\Delta Ct < 1$ (3 балла)	миРНК-205, $\Delta Ct < 3,5$ (1 балл)	миРНК-21, $\Delta Ct > 20$ (1 балл)	миРНК-200a, $\Delta Ct > 0,035$ (1 балл)		
8	0	1	0	0	1	Фиброаденома
14	3	1	1	1	6	РМЖ
61	3	0	0	0	3	Фиброаденома

Рис. 3. Примеры использования анализа 4 миРНК для уточнения цитологического диагноза 3 образцов

Таблица 2. Корреляция экспрессионных изменений миРНК и клинически значимых характеристик РМЖ

Критерий	Группа сравнения (А/В)	миРНК с различными уровнями экспрессии в сравниваемых группах
Степень дифференцировки опухоли	G ₃ /G ₁₋₂	миРНК-222 ↑: 3,66 (*) миР-146b ↑: 5,11 (***)
Поражение регионарных лимфатических узлов	TxN1–3M0/ TxN0M0	миРНК-21 ↑: 1,55 (ns) миРНК-155 ↑: 1,53 (ns) миРНК-200a ↑: 2,65 (ns)
Снижение экспрессии рецепторов эстрогена	ER < 8/ER8	миРНК-21 ↓: 0,53 (ns) миРНК-221 ↑: 3,41 (ns) миРНК-146b ↑: 3,85 (*)
Экспрессия HER2/neu	HER2 (+)/ HER2 (–)	миРНК-21 ↑: 1,6 (ns) миРНК-205 ↑: 1,9 (ns) миРНК-200a ↓: 0,56 (ns)
Пролиферативный потенциал	Ki-67 > 50/ Ki-67 < 50	миРНК-20a ↑: 0,45 (ns) миРНК-125b ↓: 0,52 (*)
Трижды негативный фенотип	TNBC/luminal	миРНК-222 ↑: 2,32 (*) миРНК-155 ↑: 9,03 (*) миРНК-20a ↑: 4,41 (*)

Примечание. Информация по каждой миРНК включает название, характер (↑ – повышение, ↓ – понижение) и порядок изменения уровня экспрессии при сравнении групп А и В; статистическая значимость, определенная по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,5$ (*); $p < 0,05$ (**); $p < 0,005$ (***) ; ns – наблюдаемые изменения не являются статистически значимыми.

уровней экспрессии миРНК-20a и миРНК-125b, хотя наблюдаемые изменения не были статистически значимыми. Рецепторный статус опухоли, определяемый путем иммуногистохимического исследования биопсийного или операционного материала и крайне важный для выбора терапии, также характеризуется специфическими изменениями профиля экспрессии миРНК. Снижение уровня экспрессии рецепторов эстрогенов сопровождается снижением экспрессии миРНК-21 и повышением экспрессии миРНК-221 и миРНК-146b. Экспрессия клетками опухоли рецептора эпидермального фактора роста HER2 коррелирует с повышением экспрессии миРНК-21 и миРНК-205 и снижением экспрессии миРНК-200a. Статистически значимая разница уровней экспрессии 3 миРНК (миРНК-222, миРНК-155 и миРНК-20a) обнаружена между группой препаратов опухолей с TNBC и люминальным (luminal) фенотипами. Кроме того, выявлено, что повышение экспрессии миРНК-21, миРНК-155 и миРНК-200a может указывать на вероятность метастатического поражения регионарных лимфатических узлов.

В целом полученные данные пока недостаточны для формирования четких диагностических алгоритмов, но отчетливо демонстрируют возможность получения клинически значимой информации из материала цитологического мазка путем анализа профиля миРНК.

Обсуждение

В представленной работе описан метод выделения и анализа миРНК из материала цитологических пре-

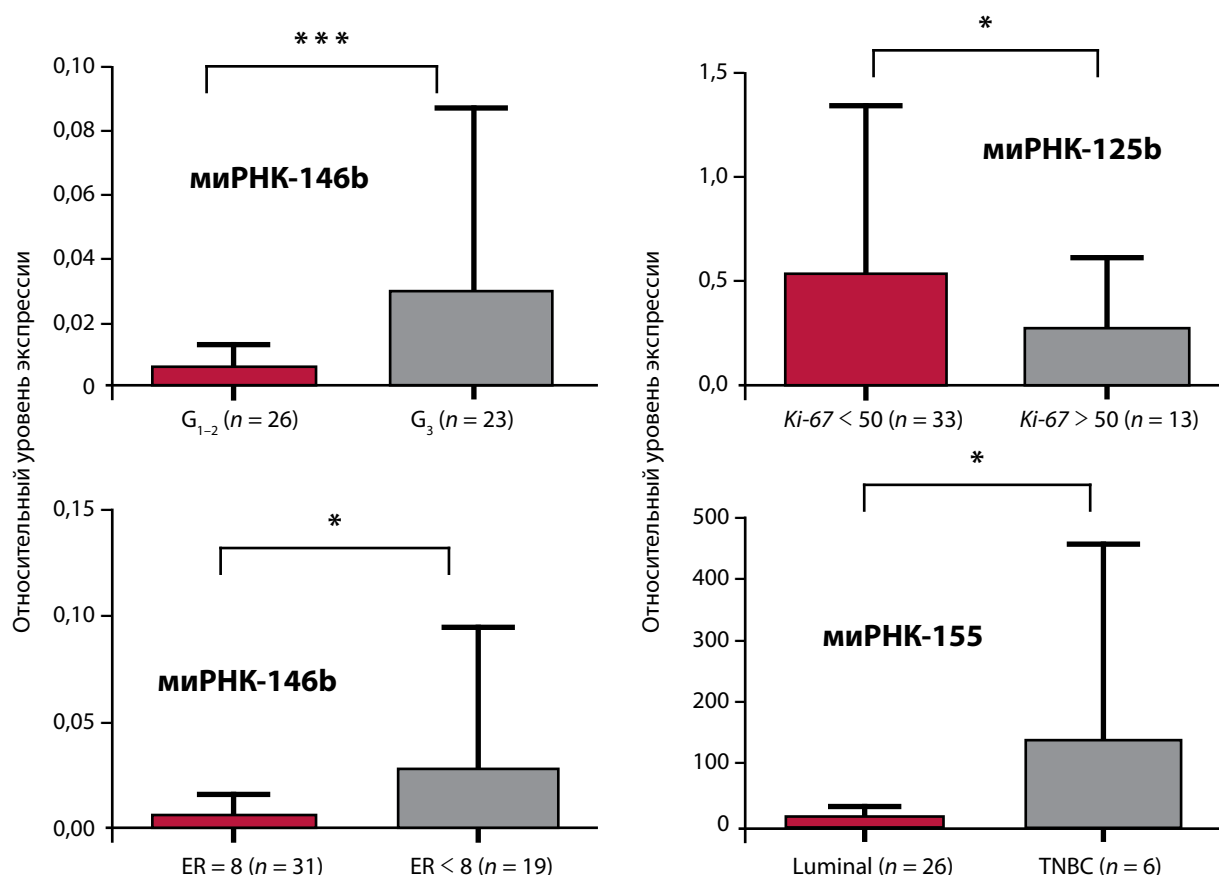


Рис. 4. Примеры корреляций изменений уровней экспрессии миРНК (медиана; 0,75 квантиль) и клинически значимых характеристик РМЖ. Результаты рассчитаны относительно уровня экспрессии яРНК U6 ($2^{(Ct\ U6 - Ct\ miR\ of\ interest)}$); показаны стандартные отклонения для сравниваемых групп, численность которых представлена в скобках; статистическая значимость определена по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,5$ (*); $p < 0,005$ (***)

паратов и обоснована целесообразность использования этого способа в ходе дифференциальной диагностики опухолей молочной железы. Это пилотное исследование показывает возможность применения метода как в рутинной клинической практике, так и в целях ретроспективного анализа.

В последние несколько лет опубликованы тысячи научных работ о роли миРНК в развитии онкологических заболеваний, включая РМЖ. Теоретические знания постепенно реализуются в создании новых методов диагностики и лечения. В частности, на мировом рынке лабораторных услуг появилось несколько компаний, предлагающих тест-системы на основе анализа миРНК в биологических жидкостях или в опухолевой ткани в целях уточнения/верификации диагноза (например, Exosome Diagnostics, Rosetta Genomics). Однако внедрение таких тест-систем в широкую клиническую практику требует решения 2 задач: оптимизации методов анализа и разработки алгоритмов интерпретации полученных данных. Результаты нашей работы показали необходимость дополнительных исследований по обоим направлениям. В частности, методы выделения РНК для последующего анализа миРНК должны обеспечивать сохранность коротких молекул, что достигается использованием специфических сорбентов и оптимизацией композиций буфе-

ров и растворов, используемых при выделении. Нетривиальной задачей является количественный анализ миРНК в образцах. Наиболее широко используется метод ОТ и последующей ПЦР, но получение достоверных и воспроизводимых результатов с помощью ОТ-ПЦР сопряжено с рядом сложностей. Во-первых, короткая последовательность (20–22 нуклеотидов) миРНК затрудняет подбор праймеров и проб. Во-вторых, существование «родственных», частично гомологичных молекул снижает специфичность анализа. В-третьих, в образце могут содержаться молекулы одного типа миРНК, находящиеся на разных этапах биогенеза и имеющие фрагменты аналогичных последовательностей, но различную функциональную значимость. Все эти особенности влияют на эффективность ОТ-ПЦР и получаемые результаты.

Не менее важной задачей является разработка алгоритмов интерпретации полученных данных. Дизайн научных исследований обычно предполагает сравнение групп образцов/пациентов, что дает возможность оценить общие тенденции изменения профиля экспрессии миРНК, связанные с определенной патологической особенностью ткани. Но популяционный полиморфизм и индивидуальные особенности каждой опухоли закономерно формируют специфический «персональный» профиль миРНК в каждом клиниче-

ском случае. Можно предположить, что диагностическое значение имеют несколько молекул/десятков молекул миРНК, так называемый «онкомир», по характерному изменению которых можно делать клинически значимые заключения. Наше исследование было ограничено анализом лишь 9 молекул миРНК. Предложенный простой алгоритм интерпретации результатов исследования экспрессии 4 из них позволил добиться относительно высоких показателей диагностической значимости оценки (чувствительность — 0,88; специфичность — 0,61). Есть основания полагать, что расширение списка «маркерных» молекул и более комплексный анализ их «взаимоизменений» может оптимизировать чувствительность и специфичность метода.

Показанные в рамках исследования корреляции экспрессионных изменений миРНК и иммуногистохимических/молекулярно-генетических признаков опухоли имеют особую практическую значимость. При этом полученные данные согласуются с результатами ранее опубликованных исследований. Так, например, показано участие миРНК-146b в регуляции подавления пролиферации клеток РМЖ в ответ на тамоксифен (нестероидный антиэстроген, используемый для лечения гормонозависимых форм РМЖ) [16]. Наблюдаемое повышение экспрессии миРНК-146b может отражать адаптивную реакцию клетки на снижение или функциональную блокаду экспрессии рецепторов эстрогенов.

Прогностическая значимость миРНК-155 в ситуации TNBC была описана в недавней работе итальянских исследователей [10]. В частности, показано, что анализ экспрессии миРНК-155 может быть использован для выделения так называемого «пятикратно» негативного типа РМЖ (ER-/PR-/HER2-/EGFR-/CK5-), что может иметь непосредственное клиническое значение. Корреляция между экспрессионными изменениями миРНК-20a и формированием TNBC, выявленная в нашем исследовании, также подтверждается результатами других работ [17]. При этом неко-

торые полученные результаты требуют дополнительных исследований. Например, в ряде работ было показано, что семейство молекул миРНК-200 ингибирует миграционную активность клеток РМЖ [18] и снижение экспрессии этих молекул ассоциировано с развитием метастазов в регионарных лимфатических узлах [19]. Наши результаты противоречат этим наблюдениям, что требует более детального исследования роли этих молекул в процессе метастатической диссеминации и дополнительной валидации полученных данных.

Выводы

Материал ТАПБ, использованный для традиционного цитологического исследования, пригоден для изоляции РНК и анализа профиля экспрессии миРНК методом ОТ-ПЦР.

Анализ экспрессии 4 миРНК (миРНК-125b, миРНК-21, миРНК-205 и миРНК-200a) позволяет отличить биопсийный материал РМЖ от материала доброкачественных образований молочной железы. При этом чувствительность анализа составляет 0,88, специфичность — 0,61, PPV — 0,8, NPV — 0,74.

Особенности профиля экспрессии миРНК в материале цитологического мазка коррелируют с гистологическими (G), иммуногистохимическими (ER, HER2, Ki-67), молекулярно-генетическими (luminal, TNBC) и клиническими (наличие регионарных метастазов) характеристиками.

Дополнительные исследования необходимы для оценки диагностической значимости наблюдаемых корреляций и разработки соответствующих диагностических алгоритмов.

В целом представленное исследование показало высокую перспективность дальнейшей работы в целях создания и внедрения в клиническую практику диагностических и прогностических методов, основанных на анализе миРНК в различных образцах, включая материал ТАПБ в рамках диагностики РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2012 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2014. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2012 (morbidity and fatality). Moscow: P.A. Herzen Moscow Cancer Research Institute, Ministry of Health of Russia, 2014. (In Russ.).]
- Stolier A., Skinner J., Levine E.A. A prospective study of seeding of the skin after core biopsy of the breast. *Am J Surg* 2000;180(2):104–7.
- Di Leva G., Garofalo M., Croce C.M. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2014;9:287–314.
- Kolesnikov N.N., Titov S.E., Veriaskina Iu.A. et al. MicroRNA, evolution and cancer. *Tsitologiya* 2013;55(3):159–64.
- Takahashi R.U., Miyazaki H., Ochiya T. The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. *Cancers* 2015;7(2):598–616.
- Bertoli G., Cava C., Castiglioni I. MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. *Theranostics* 2015;5(10):1122–43.
- Graveel C.R., Calderone H.M., Westerhuis J.J. et al. Critical analysis of the potential for microRNA biomarkers in breast cancer management. *Breast Cancer* 2015;7:59–79.
- Bhattacharyya M., Nath J., Bandyopadhyay S. MicroRNA signatures highlight new breast cancer subtypes. *Gene* 2015;556(2):192–8.
- Веряскина Ю.А., Титов С.Е., Родионов В.В. др. Экспрессия микроРНК в молекулярно-генетических подтипах

- рака молочной железы. Современные проблемы науки и образования 2015;5. [Véryaskina Yu.A., Titov S.E., Rodionov V.V. et al. MicroRNA experssion in molecular & genetic subtype of the mammary gland cancer. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Science and Education Problems 2015;5. (In Russ.)].
10. Gasparini P., Cascione L., Fassan M. et al. MicroRNA expression profiling identifies a four microRNA signature as a novel diagnostic and prognostic biomarker in triple negative breast cancers. *Oncotarget* 2014;5(5):1174–84.
11. Kolacinska A., Morawiec J., Fendler W. et al. Association of microRNAs and pathologic response to preoperative chemotherapy in triple negative breast cancer: preliminary report. *Mol Biol Rep* 2014;41(5):2851–7.
12. Ouyang M., Li Y., Ye S. et al. MicroRNA profiling implies new markers of chemoresistance of triple-negative breast cancer. *PloS One* 2014;9(5):e96228.
13. Harquail J., Benzina S., Robichaud G.A. MicroRNAs and breast cancer malignancy: an overview of miRNA-regulated cancer processes leading to metastasis. *Cancer Biomark* 2012;11(6):269–80.
14. Tanic M., Yanowski K., Andres E. et al. MiRNA expression profiling of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) hereditary breast tumors. *Genom Data* 2015;3:75–9.
15. Kolacinska A., Morawiec J., Pawlowska Z. et al. Association of microRNA-93, 190, 200b and receptor status in core biopsies from stage III breast cancer patients. *DNA Cell Biol* 2014;33(9):624–9.
16. Phuong N.T., Kim S.K., Im J.H. et al. Induction of methionine adenosyltransferase 2A in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Oncotarget* 2015.
17. Calvano Filho C.M., Calvano-Mendes D.C., Carvalho K.C. et al. Triple-negative and luminal A breast tumors: differential expression of miR-18a-5p, miR-17-5p, and miR-20a-5p. *Tumour Biology* 2014;35(8):7733–41.
18. Xu F., He H., Huang W. et al. Decreased expression of MicroRNA-200 family in human breast cancer is associated with lymph node metastasis. *Clin Transl Oncol* 2016;18(3):283–8.
19. Tsouko E., Wang J., Frigo D.E. et al. MiR-200a inhibits migration of triple-negative breast cancer cells through direct repression of the *EPHA2* oncogene. *Carcinogenesis* 2015;36(9):1051–60.
20. Usmani A., Shoro A.A., Memon Z. et al. Diagnostic, prognostic and predictive value of MicroRNA-21 in breast cancer patients, their daughters and healthy individuals. *Am J Cancer Res* 2015;5(8):2484–90.
21. Eissa S., Matboli M., Sharawy A., El-Sharkawi F. Prognostic and biological significance of microRNA-221 in breast cancer. *Gene* 2015;574(1):163–7.
22. Li Y., Liang C., Ma H. et al. MiR-221/222 promotes S-phase entry and cellular migration in control of basal-like breast cancer. *Molecules* 2014;19(6):7122–37.
23. Yu D.D., Lv M.M., Chen W.X. et al. Role of miR-155 in drug resistance of breast cancer. *Tumour Biol* 2015;36(3):1395–401.
24. Zhang H., Fan Q. MicroRNA-205 inhibits the proliferation and invasion of breast cancer by regulating AMOT expression. *Oncol Rep* 2015;34(4):2163–70.
25. Vilquin P., Donini C.F., Villedieu M. et al. MicroRNA-125b upregulation confers aromatase inhibitor resistance and is a novel marker of poor prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2015;17:13.
26. Hurst D.R., Edmonds M.D., Scott G.K. et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2009;69(4):1279–83.