

УДК: 618.19-006.6:615.28:575.224.23

МИКРОМАТРИЧНЫЙ АНАЛИЗ АНОМАЛИЙ ЧИСЛА КОПИЙ ДНК ОПУХОЛИ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ: СВЯЗЬ С ЭФФЕКТОМ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

**Н.В. Литвяков^{1,2}, М.М. Цыганов^{1,2}, Н.В. Чердынцева^{1,2,3}, Е.М. Слонимская^{1,3},
П.В. Иваньковская¹, М.К. Ибрагимова¹, Е.Ю. Гарбуков¹, С.А. Коростелев⁴,
О.Ю. Потапова⁵, Е.Л. Чойнзонов^{1,3}**

ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН, г. Томск¹

Национальный исследовательский Томский государственный университет, г. Томск²

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения РФ, г. Томск³

ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»

Министерства здравоохранения РФ, г. Москва⁴

Cureline East Research Inc, USA⁵

634050, г. Томск, пер. Кооперативный, 5, e-mail: nvlitv72@yandex.ru¹

Представлены новые данные об аномалиях числа копий ДНК (Copy Number Aberration – CNA) в опухолях молочной железы и их связи с эффективностью неоадьювантной химиотерапии.

Методы. В исследование включены 68 больных раком молочной железы (РМЖ), получавшие 2–4 курса неоадьювантной химиотерапии (НАХТ). Исследование несбалансированных хромосомных перестроек – числовых и структурных CNA – проводили в биопсийных образцах опухолевой ткани, полученных до лечения, с использованием микроматрицы высокой плотности CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). Непосредственную эффективность НАХТ оценивали по критериям ВОЗ.

Результаты. Амплификация 1q43 связана с хорошим ответом на НАХТ. У 83 % (33/39) больных с амплификацией 1q43 наблюдается частичная регрессия опухоли, тогда как у 78 % (18/23) больных с нормальным состоянием 1q43 хромосомного региона ответ на терапию отсутствует ($p=0,00085$ по критерию Фишера с поправкой Бонферрони). У 83 % (25/30) больных с делецией 11q22.1-23.3 отмечается ответ на НАХТ, а 68 % (23/34) больных с нормальным состоянием региона не отвечали на лечение ($p=0,000047$). Сочетание «амплификационных» и «делеционных» маркеров увеличивает чувствительность и специфичность прогнозирования ожидаемой эффективности НАХТ. Если наблюдаются амплификация в 1q43 и/или делеция 18p11.21 локусах, то у 92 % больных (35/38) отмечается частичная регрессия, при нормальном состоянии этих локусов у 81 % больных (21/26) отсутствует ответ на НАХТ ($p=0,000002$).

Заключение. Наличие несбалансированных хромосомных перестроек в регионах 1q, 11q и 18p ДНК опухоли молочной железы до лечения коррелирует с выраженным эффектом химиотерапии и может быть использовано в качестве маркера для прогнозирования ожидаемой эффективности НАХТ с высоким уровнем достоверной вероятности.

Ключевые слова: рак молочной железы, микроматричный анализ, хромосомные аномалии, факторы прогноза, неоадьювантная химиотерапия.

MICROARRAY ANALYSIS OF DNA COPY NUMBER ABERRATION IN BREAST TUMOR: CORRELATION WITH THE EFFICACY OF NEOADJUVANT CHEMOTHERAPY

N.V. Litviakov^{1,2}, M.M. Tsyganov^{1,2}, N.V. Cherdyntseva^{1,2,3}, E.M. Slonimskaya^{1,3}, P.V. Ivankovskaya¹, M.K. Ibragimova^{1,5}, E.Yu. Garbukov¹, S.A. Korostelev⁴, O.Yu. Potapova⁵, E.L. Choinzonov^{1,3}

Cancer Research Institute, Siberian Branch of the RA MS, Tomsk¹

National Research Tomsk State University, Tomsk²

Siberian State Medical University, Tomsk³

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow⁴

Cureline East Research Inc, USA⁵

5, Kooperativnyi Street, 634050-Tomsk, Russia, e-mail: nvlitv72@yandex.ru¹

This study presents the new evidences for DNA Copy Number Aberration (CNA) within breast tumors and its association with the efficacy of preoperative (neoadjuvant) chemotherapy.

Methods. 68 breast cancer patients were treated with 2–4 courses of neoadjuvant chemotherapy. Unbalanced chromosome abnormalities – numeric and structural CNA in biopsy specimens were tested using high-density microarray platform CytoScan™ HD Array (Affymetrix, USA). Immediate tumor response to NAC was measured in accordance with recommendations of WHO.

Results. 1q43 amplification correlated with good response to NAC. Partial tumor regression was observed in 83 % (33/39) of patients with 1q43 amplification, whereas no response to NAC was found in 78 % (18/23) of patients with normal 1q43 region ($p=0.00085$ Fisher test, Bonferroni correction). Among patients with chromosomal deletions at 11q22.1-23.3, 83 % (25/30) manifested the response to NAC, whereas 68 % (23/34) deletion-free persons did not respond to therapy. Combination of amplification and deletion markers increased the sensitivity and specificity for predicting response to NAC. Amplification in 1q43 along with deletion in 18p11.21 loci resulted in partial tumor regression in 92 % (35/38) of patients. In the case of the normal status of these loci, 81 % (21/26) of patients had no response to NAC ($p=0.000002$).

Conclusion. The presence of unbalanced, chromosome abnormalities in 1q, 11q and 18p loci within breast tumors before treatment correlates with good response to NAC and can be used as a marker for predicting response to neoadjuvant chemotherapy with high confidence interval.

Key words: breast cancer, microarray analysis, chromosomal abnormalities, prognostic factors, neoadjuvant chemotherapy.

Делеции или амплификации хромосомных регионов и отдельных хромосом называют абберациями числа копий ДНК (CNA – copy number aberration). Эти типы цитогенетических нарушений могут влиять на экспрессию генов, локализованных в абберантных регионах. Делеции приводят к снижению экспрессии генов, а амплификации – к повышению [14, 21]. CNA особенно распространены в солидных опухолях различных локализаций и, в частности, в опухоли молочной железы (www.progenetix.org [7, 13]).

В опухолях молочной железы наиболее часто CNA наблюдается в регионах 1q, 8q и 16q. Амплификации отмечаются в 1q, 8p12, 8q24.21, 17q12, 11q13.3 и 11q13.5, в которых локализованы такие известные онкогены, как *HER2*, *c-Myc*, *CCND1* и *PAK1*, делеции – 8p, 11q, 16q и 17p хромосомных локусов [15]. Есть сведения о связи CNA опухолевой ДНК с молекулярными подтипами рака молочной железы (РМЖ) и экспрессионными характеристиками опухоли [4, 12, 13, 19]. Например, амплификации 1q21-43 и 16p12 хромосомных

регионов и делеция 16q21-24 связаны с наличием на клетках опухоли рецепторов к эстрогену, а делеции 4p13-16 и 5q11.2-31 сайтов ассоциированы с отсутствием рецепторов к прогестерону [9].

Большой интерес представляют работы, посвященные поиску специфических CNA паттернов, характеризующих высокий риск метастазирования РМЖ. В частности, установлено, что амплификации 8q22.3 и 11q14.1 регионов связаны с более низкими показателями безметастатической и общей выживаемости пациентов [8, 22]. Наличие делеции длинного плеча 11q хромосомы является неблагоприятным прогностическим фактором у больных с трижды негативным молекулярным подтипом рака молочной железы (клетки опухоли не имеют рецепторов к эстрогенам, прогестерону и эпидермальному фактору роста HER2), которые не получали послеоперационную химиотерапию [9]. В исследовании Н. Wikman et al. (2012) установлена область 11p15, делеция которой ассоциирована с высокой частотой метастазирования в головной мозг [20].

Комбинированное лечение больных РМЖ включает неоадьювантную химиотерапию (НАХТ), которая направлена на уменьшение объема опухоли до резектабельных размеров или создает условия для проведения органосохранных операций. Однако регрессия опухоли при НАХТ наблюдается далеко не у всех больных, при этом не существует стандартных критериев прогноза непосредственного эффекта химиотерапии [2, 16]. Исследований, касающихся связи CNA с эффективностью НАХТ при РМЖ, немного. В работе корейских ученых на 15 образцах опухоли больных РМЖ, у которых не наблюдалось эффекта от НАХТ таксанами, установлены амплификации в 8q (24.3, 24.22, 22.1-3), 13q21.1 и 20q (13.2-13.33) регионах и делеции 8p23.3-1 и 17p13.3 сайтов [11]. Показано, что повышенный уровень CNA определяет неэффективность терапии таксанами и усиливает чувствительность к препаратам платины [17]. Учитывая немногочисленность и разрозненность клинических исследований, посвященных ассоциации CNA с эффективностью неоадьювантной химиотерапии, особенно в полногеномном масштабе, и важность самого этапа НАХТ в лечении больных РМЖ [10], представлялось актуальным проведение микрочипового исследования аберраций числа копий ДНК в опухоли молочной железы и оценка их ассоциации с эффектом неоадьювантной химиотерапии.

Материал и методы

В исследование включены 68 больных РМЖ ПА–IIIС стадии, с морфологически верифицированным диагнозом, в возрасте 28–68 лет, в среднем – $53,43 \pm 0,78$ года (таблица). В соответствии с «Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania» [18] все больные получали 2–4 курса неоадьювантной химиотерапии по схемам FAC (фторурацил, доксорубин, циклофосфан), САХ (циклофосфан, доксорубин, кселода) или монотерапию таксотером. Через 3–5 нед после НАХТ проводилась операция, затем больным проводили 2 курса адьювантной химиотерапии по схеме FAC, а лучевая терапия и/или гормональное лечение назначались по показаниям. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией 1964 г. (исправленной в 1975 и 1983 гг.), получено разрешение локального этического комитета ФГБУ «НИИ онкологии» СО РАМН. Были использованы биопсийные опухолевые образцы

(~10 мм³), взятые до лечения под контролем УЗИ. Образцы опухоли замораживали в жидком азоте и сохраняли при температуре –80°C для выделения ДНК.

Эффективность предоперационной химиотерапии оценивали по критериям ВОЗ с помощью УЗИ и маммографии. Из исследования были исключены образцы больных, у которых была полная морфологическая регрессия опухоли, в связи с малочисленностью этой группы. Согласно международным рекомендациям, при проведении предоперационной химиотерапии больные РМЖ со стабилизацией или прогрессированием составляют группу с отсутствием ответа на НАХТ, а больные с частичной регрессией – группу с объективным клиническим ответом [16].

До лечения ДНК выделяли из 68 биопсийных образцов опухолевой ткани с помощью набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Germany) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК и чистоту выделения оценивали на спектрофотометре NanoDrop-2000 (Thermo Scientific, USA) (от 50 до 150 нг/мкл, $A_{260}/A_{280} = 2.10–2.35$; $A_{260}/A_{230} = 2.15–2.40$). Целостность ДНК оценивалась при помощи капиллярного электрофореза на приборе TapeStation (Agilent Technologies, USA), фрагменты ДНК имели массу более 48 kbp.

Микроматричный анализ проводили на микроматрицах (ДНК-чипах) высокой плотности фирмы Affymetrix (USA) CytoScan™ HD Array, (<http://www.affymetrix.com/eseach/search.jsp?pd=prod520004&N=4294967292>), которые содержат 2 млн 670 тыс. маркеров – 1 млн 900 тыс. непалиморфных маркеров и более 750 тыс. однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), позволяющих определить структурные вариации более чем 36 тысяч генов. Наличие полиморфных маркеров на микроматрице позволяет также определить участки с потерей гетерозиготности. Процедуры пробоподготовки, гибридизации и сканирования проводили в соответствии с протоколом производителя на системе Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, USA).

Для обработки результатов микрочипирования использовали программу «Chromosome Analysis Suite 2.0» (Affymetrix, USA), которая разработана специально для анализа результатов микрочипирования на матрице CytoScan™ HD Array. В хромосомах определяли несбалансированные хро-

Таблица

Клинико-патологические параметры обследованных больных РМЖ

Клинико-патологический параметр		Число больных
Возраст (лет)	≤45	21 (30,9 %)
	>45	47 (69,1 %)
Менструальный статус	Пременопауза	36 (52,9 %)
	Постменопауза	32 (47,1 %)
Гистологический тип	Инвазивный протоковый рак	58 (85,3 %)
	Инвазивный дольковый рак	3 (4,4 %)
	Медулярный рак	2 (2,9 %)
	Другие типы	5 (7,4 %)
Размер опухоли	T ₁	9 (13,2 %)
	T ₂	52 (76,5 %)
	T ₃	3 (4,4 %)
	T ₄	4 (5,9 %)
Лимфогенное метастазирование	N ₀	27 (39,7 %)
	N ₁	31 (45,6 %)
	N ₂	4 (5,9 %)
	N ₃	6 (8,8 %)
Рецепторы эстрогена	+	33 (48,5 %)
	–	31 (42,6 %)
	Нет данных	4 (5,9 %)
Рецепторы прогестерона	+	35 (51,5 %)
	–	29 (42,26 %)
	Нет данных	4 (5,9 %)
Рецепторы эпидермального фактора роста HER2	0/+	47 (69,1 %)
	++	10 (14,7 %)
	+++	6 (8,8 %)
	Нет данных	5 (7,4 %)
Молекулярный подтип	Люминальный В	40 (59,7 %)
	Трижды негативный	17 (25,4 %)
	HER2-позитивный	10 (14,9 %)
Гистологическая форма	Уницентрическая	45 (66,2 %)
	Мультицентрическая	23 (33,8 %)
Степень лекарственного патоморфоза	1 степень	21 (30,9 %)
	2 степень	22 (32,4 %)
	3 степень	6 (8,8 %)
	Нет данных	19 (27,9 %)
Степень злокачественности	1 степень	2 (2,9 %)
	2 степень	48 (70,6 %)
	3 степень	6 (8,8 %)
	Нет данных	12 (17,6 %)
Схема НАХТ	СAX	21 (30,9 %)
	FAC	33 (48,5 %)
	Тасотер	14 (20,6 %)
Ответ на НАХТ	Объективный клинический ответ	40 (58,8 %)
	Отсутствие ответа	28 (41,2 %)

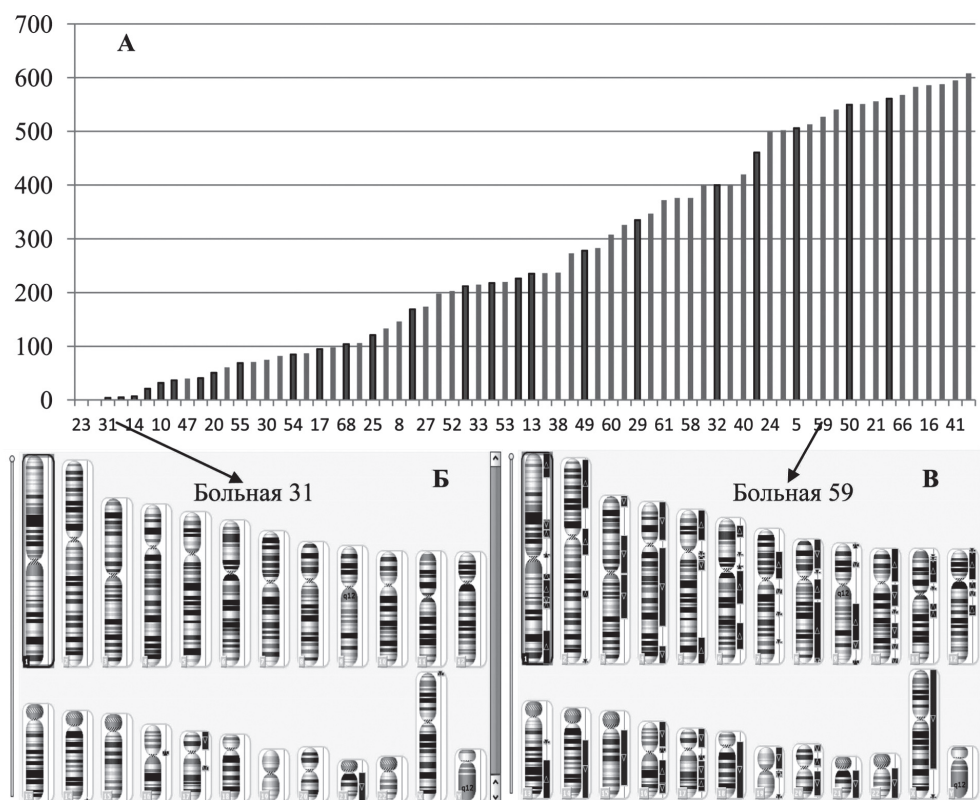


Рис. 1. Амплификации и делеции в ДНК опухолевой ткани больных РМЖ:

а) количество цитобэндов с CNA (делеции + амплификации) индивидуально у каждой больной раком молочной железы до лечения;

б) у больной 31 (слева) в опухолевой ткани практически отсутствуют CNA; в) у больной 59 CNA присутствуют в каждой хромосоме.

Примечание: на рис. 1а по оси абсцисс – номера больных, по оси ординат – количество цитобэндов с CNA, темные столбики – отсутствие ответа на НАХТ (стабилизация или прогрессирование); на рис 1б и 1в представлены окна программы «Chromosome Analysis Suite 2.0», участки амплификации выделены синим, участки делеций – красным

мосомные aberrации – делеции и амплификации (Loss и Gain). Поскольку в образцах опухолевой ткани обязательно присутствуют стромальные элементы и другие нормальные клетки, в полученной ДНК высок процент нормальной геномной ДНК. Микрочип CytoScan™ HD Array позволяет выявлять 5 % и более мутантной ДНК. Практически во всех случаях CNA были мозаичными, т.е. мутантная опухолевая ДНК определялась на фоне нормальной ДНК. Процент мутантной ДНК – статус числа копий (CN-state) – колебался от 15 до 88 %. В программе «Chromosome Analysis Suite 2.0» мозаицизм графически представляется аллельными пиками (Allele Peaks) с 4 «полосками» (AAA, AAB, ABB, BBB). Показатель snpQC колебался от 9 до 25 и отрицательно коррелировал с частотой CNA. Даже при низких значениях snpQC ширина Allele

Peaks была «хорошей» (по классификации базы progenetix [7]) для идентификации CNA.

При помощи программы «Chromosome Analysis Suite 2.0» оценивали наличие структурных CNA во всех 852 цитобэндах всех хромосом. Статистическую значимость связи частоты цитобэндов с CNA и эффекта НАХТ анализировали при помощи двухстороннего критерия Фишера. Отношение шансов – OR, относительный риск – RR и уровень значимости p по двухстороннему критерию Фишера вычисляли при помощи калькулятора <http://vassarstats.net/odds2x2.html>. Для поправки на множественные сравнения использовали поправку Бонферрони.

Результаты исследования

Количество цитобэндов с CNA в опухолях разных пациентов колеблется в очень широких пределах: от 1 до 608, что составляет от 0,1 %

до 75 % от общего числа цитобэндов (рис. 1а), т.е. можно говорить о континууме частоты CNA. Встречаются пациенты, у которых в опухоли могут присутствовать протяженные делеции или амплификации в каждой хромосоме, в то время как у других они практически отсутствуют (рис. 1в и 1б соответственно).

Средняя частота выявленных амплификаций была почти в 2 раза ниже, чем частота делеций (92 против 170, $p=0,0002$), у 70,6 % (48/68) больных амплификации встречались реже, чем делеции. В группе больных, у которых амплификаций было больше, чем делеций, общая частота CNA в цитобэндах в 3 раза меньше, чем у больных, у которых делеции встречались чаще, чем амплификации (100 против 334, $p=0,000001$).

Количество цитобэндов с CNA связано с эффективностью НАХТ. В группе больных РМЖ с числом цитобэндов с CNA менее 60 (11/68 – 16 %) у 82 % (9/11) отмечается отсутствие ответа на НАХТ (стабилизация или прогрессирование). У 41 % (28/68) пациентов отмечается высокий уровень CNA, и частота цитобэндов с делециями или амплификациями составляет более 300. Отвечают на НАХТ 75% (21/28) этих больных. Можно полагать, что существенный дисбаланс клеточных сигналов в опухоли, связанный с большим количеством CNA и развитием генетической нестабильности, способствует более выраженному цитотоксическому действию конвенциональных химиопрепаратов, используемых при лечении. Прежде всего, это касается лекарственных средств, действующих на молекулу ДНК (циклофосфан, фторурацил, кселода, препараты платины). Это подтверждают S.E. McClelland et al. (2009), которые показали связь повышенного уровня CNA с резистентностью к таксанам и чувствительностью к препаратам платины [17]. Весьма вероятно, что оценка числа цитобэндов с CNA будет полезной при выборе химиопрепаратов для предоперационной терапии больных РМЖ.

На следующем этапе проанализирована связь изменений всех 852 цитобэндов с эффективностью НАХТ. На рис. 2 представлены частоты CNA в опухоли больных с частичной регрессией (рис. 2а) и отсутствием ответа на НАХТ (рис. 2б). Отдельно вычислена разница в частоте амплификаций или делеций (рис. 2в) между опухолями пациентов (ответивших и не ответивших на НАХТ). Наи-

большая разница по амплификациям (40–60 %) наблюдалась в длинном плече 1 хромосомы (максимальная – для цитобэнда 1q43). Амплификация длинного плеча 1 хромосомы (1q23.2-1q43) ассоциирована с хорошим ответом на НАХТ. У 76–83 % больных с амплификацией длинного плеча 1 хромосомы наблюдается частичная регрессия, тогда как у 60–78 % больных с нормальным состоянием 1q23.2-1q43 хромосомного региона отмечается отсутствие ответа на НАХТ. Анализ с использованием критерия Фишера показал, что наличие/отсутствие амплификации в 1q43 цитобэнде можно использовать в качестве маркера ожидаемой эффективности НАХТ рака молочной железы с отношением шансов $OR=19,8$ (5,29–74,01), относительным риском $RR=5,09$ (2,36–10,95) ($p=0,000001$ по критерию Фишера или $p=0,00085$ с поправкой Бонферрони на множественные сравнения), чувствительностью – 83 % (33/39) и специфичностью – 78 % (18/23) (все вычисления произведены для цитобэнда 1q43).

Наибольшая разница по частоте встречаемости делеций (30–40 %) в опухолях пациентов с наличием и отсутствием ответа наблюдается в длинном плече 11 и 16 хромосом и коротком плече 18 хромосомы. У 83 % (25/30) больных с делецией 11q22.1-23.3 отмечается частичная регрессия при проведении НАХТ, а у 68 % (23/34) больных с нормальным состоянием региона отмечено отсутствие ответа на НАХТ. Наличие делеции в 11q22.1–23.3 регионе может выступать как маркер ожидаемой эффективности НАХТ с отношением шансов $OR=10,45$ (3,15–34,68) и относительным риском $RR=2,58$ (1,54–4,59) ($p=0,000047$ по критерию Фишера) с чувствительностью – 83 % и специфичностью – 68 %. При поправке Бонферрони уровень доверительной вероятности по критерию Фишера становится равным $p=0,04$. При делеции 18p11.21 отмечается 100 % специфичность, все больные с делецией имеют объективный клинический ответ на НАХТ.

Мы провели анализ предсказательной значимости сочетания «амплификационных» и «делеционных» маркеров. Если наблюдаются амплификации в 1q23.1-25.3 и/или делеции 11q22-24, то в 85 % (40/47) случаев отмечается частичная регрессия опухоли, если же у больных нормальное состояние 1q23.1-25.3 и 11q22-24 регионов, то в 86 % (18/21) случаев ответ на НАХТ отсутствует ($p=3,4 \times 10^{-8}$

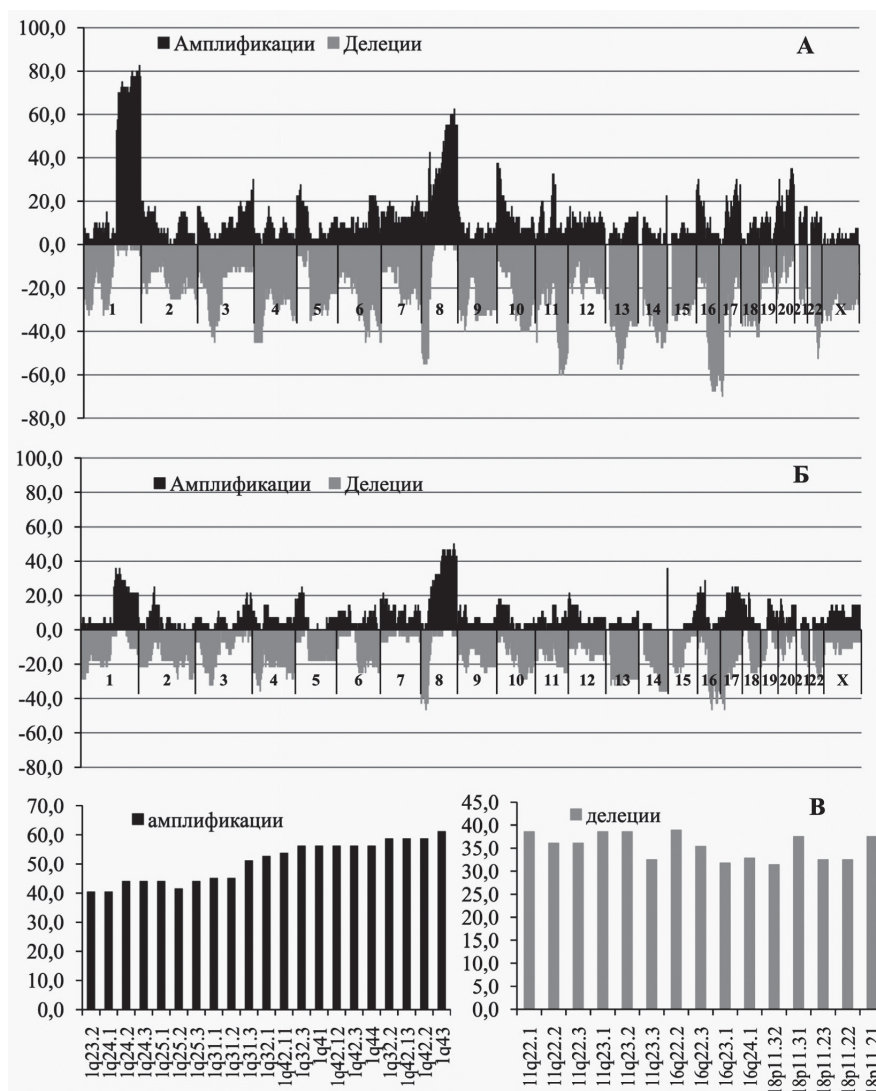


Рис. 2. Частота aberrаций числа копий ДНК в группе больных с объективным клиническим ответом (а) и с отсутствием ответа на НАХТ (б); в – цитобэнды, в которых наблюдалась наибольшая разность (и величина разности) в частоте амплификаций (слева) и делеций (справа) между опухолью пациентов с объективным клиническим ответом и отсутствием ответа.

Примечание: на рис. 1а и 1б по оси ординат – процент больных, несущих CNA (амплификации – выше оси абсцисс, делеции – ниже оси абсцисс), по оси абсцисс – цитобэнды (n=852), распределенные по хромосомам, на рис. 1в по оси ординат – разность в процентах; по оси абсцисс – цитобэнды, показавшие наибольшую разность

или $p=0,00003$ с поправкой Бонферрони). Другое возможное сочетание – амплификация в 1q43 и делеция 18p11.21 локусах. При наличии амплификации и/или делеции данных локусов в ДНК опухоли молочной железы у 92 % больных (35/38) отмечается объективный клинический ответ на НАХТ, при нормальном состоянии этих локусов у 81 % (21/26) больных отсутствует ответ на

химиотерапию. Использование сочетания CNA 1q43 и 18p11.21 локусов в качестве предсказательного маркера позволило бы прогнозировать эффективность НАХТ с $OR=49$ (10,61–226,33) и относительным риском $RR=4,78$ (2,17–10,78) (по критерию Фишера $p=2,3 \times 10^{-9}$ или $p=0,000002$ с поправкой Бонферрони), с чувствительностью – 92 %, специфичностью – 81 %.

Обсуждение

В настоящее время отсутствуют общепринятые критерии для прогнозирования эффективности НАХТ, решение о ее проведении принимается на основании клинических, морфологических характеристик опухоли и молекулярных подтипов [16]. ДНК микрочипы могут представлять больший интерес, по сравнению с экспрессионным анализом, для прогнозирования ожидаемой эффективности химиотерапии. Это обусловлено тем, что ДНК маркеры, в отличие от экспрессионных маркеров, относительно стабильны, а ДНК мутации и хромосомные аномалии являются основой процесса канцерогенеза и эволюции опухоли. Мутации и CNA связаны с экспрессией генов, например, мутация гена *BRCA1* 5382insC приводит к формированию стоп-кодона, при делециях экспрессия генов снижается, а при амплификациях – повышается [6, 14, 21]. Наконец, технология ДНК микрочипов может во многом нивелировать проблему внутриопухолевой гетерогенности [1, 3, 5], которая ограничивает применение экспрессионных чипов. ДНК-микрочипы позволяют с чувствительностью 5 % видеть одновременно весь спектр мутантных опухолевых клонов (генетический ландшафт опухоли). Все вышесказанное еще раз свидетельствует в пользу перспективности дальнейших исследований и валидации прогностической значимости найденных маркеров на независимых выборках.

Заключение

Таким образом, в результате исследования показана связь aberrаций числа копий ДНК опухоли молочной железы и эффективности предоперационной химиотерапии. На основе CNA идентифицированы новые информативные прогностические маркеры, которые с высоким уровнем достоверной вероятности и с учетом поправки на множественные сравнения показали связь с эффектом НАХТ. Сочетанное использование нескольких CNA маркеров повышает чувствительность (до 92 %) и специфичность (до 81 %) прогнозирования клинического эффекта в ответ на проведение системной терапии. Особую значимость представляет тот факт, что они могут определяться до начала лечения по биопсийному материалу.

Полученные данные обосновывают перспективность проведения дальнейших проспективных исследований, в которых можно было бы оценить значимость идентифицированных маркеров для

прогнозирования ожидаемой эффективности НАХТ и целесообразности ее проведения с целью индивидуализации выбора лечебной тактики.

Работа поддержана грантом РФФИ 13-04-98111 p_сибирь_a

ЛИТЕРАТУРА

1. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В., Завьялова М.В., Вторушин С.В., Цыганов М.М., Перельмутер В.М., Чердынцева Н.В. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение // Биохимия. 2013. Т. 78, № 11. С. 1531–1549.
2. Гервас П.А., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Миллер С.В., Добродеев А.Ю., Гарбуков Е.Ю., Бабышкина Н.Н., Кухарев Я.В., Васильева М.В., Слонимская Е.М., Белявская В.А., Тузилов С.А., Чердынцева Н.В. Влияние полиморфизма генов апоптоза и репарации на эффективность неoadъювантной химиотерапии злокачественных новообразований // Сибирский онкологический журнал. 2009. № 4 (34). С. 41–47.
3. Чердынцева Н.В., Литвяков Н.В., Денисов Е.В. Основные достижения в фундаментальной онкологии в 2012 году // Практическая онкология. 2013. Т. 14, № 1. С. 1–12.
4. Bergamaschi A., Kim Y.H., Wang P., Sørlie T., Hernandez-Boussard T., Lonning P.E., Tibshirani R., Borresen-Dale A.L., Pollack J.R. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. // Genes Chromosomes and Cancer. 2006. Vol. 45 (11). P.1033–1040.
5. Bhatia S., Frangioni J.V., Hoffman R.M. The challenges posed by cancer heterogeneity // Nat. Biotechnol. 2012. Vol. 30. P. 604–610. doi: 10.1038/nbt.2294.
6. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T., Grzybowska E., Budryk M., Stawicka M., Mierzwia T., Szwiec M., Wiśniowski R., Stolek M. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy // J. Clin. Oncol. 2010. Vol. 28 (3). P. 375–379. doi: 10.1200/JCO.2008.20.7019
7. Cai H., Kumar N., Baudis M. Arraymap: A reference resource for genomic copy number imbalances in human malignancies // PLoS ONE. 2012. Vol. 7 (5). E. 36944. doi: 10.1371/journal.pone.0036944.
8. Chin S.F., Teschendorff A.E., Marioni J.C., Wang Y., Barbosa-Morais N.L., Thorne N.P., Costa J.L., Pinder S.E., van De Wiel M.A., Green A.R. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer // Genome Biol. 2007. Vol. 8 (10). R. 215.
9. Climent J., Dimitrow P., Fridlyand J., Palacios J., Siebert R., Albertson D.G., Gray J.W., Pinkel D., Lluch A., Martinez-Climent J.A. Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer // Cancer Res. 2007. Vol. 67 (2). P. 818–826.
10. Goldhirsch A., Winer E., Coates A., Gelber R., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.-J., Albain K.S., André F., Bergh J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 // Ann. Oncol. 2013. Vol. 24 (9). P. 2206–2223. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
11. Han S., Park K., Shin E., Kim H.-J., Kim J.Y., Kim J.Y., Gwak G. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer // Oncol. Reports. 2010. Vol. 24 (1). P. 121–128.
12. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // Cell. 2011. Vol. 144 (5). P. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
13. Horlings H.M., Lai C., Nuyten D.S., Halfwerk H., Kristel P., van Beers E., Joosse S.A., Klijn C., Nederlof P.M., Reinders M.J. Integration of DNA copy number alterations and prognostic gene expression signatures in breast cancer patients // Clin. Cancer Res. 2010. Vol. 16 (2). P. 651–663. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0709
14. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles // Brief. Bioinform. 2012. Vol. 13 (3). P. 305–316. doi: 10.1093/bib/bbr056.

15. Jönsson G., Staaf J., Vallon-Christersson J., Ringnér M., Holm K., Hegardt C., Gunnarsson H., Fagerholm R., Strand C., Agnarsson B.A. Research article Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics // *Breast Cancer Res.* 2010. Vol. 12 (3). R. 42. doi: 10.1186/bcr2596.
16. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carey L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer // *Ann. Surg. Oncol.* 2012. Vol. 19. P. 1508–1516. doi: 10.1245/s10434-011-2108-2. E
17. McClelland S.E., Burrell R.A., Swanton C. Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8 (20). P. 3262–3266.
18. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *Breast J.* 2004. Vol. 10 (4). P. 273–294.
19. Weigman V.J., Chao H.-H., Shabalin A.A., He X., Parker J.S., Nordgard S.H., Grushko T., Huo D., Nwachukwu C., Nobel A. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 133 (3). P. 865–880. doi: 10.1007/s10549-011-1846-y.
20. Wikman H., Sielaff-Frimpong B., Kropidlowski J., Witzel I., Milde-Langosch K., Sauter G., Westphal M., Lamszus K., Pantel K. Clinical Relevance of Loss of 11p15 in Primary and Metastatic Breast Cancer: Association with Loss of PRKCDP Expression in Brain Metastases // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7 (10). E. 47537. doi: 10.1371/journal.pone.0047537.
21. Xu Y., Duanmu H., Chang Z., Zhang S., Li Z., Li Z., Liu Y., Li K., Qiu F., Li X. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast cancer // *Mol. Biol. Reports.* 2012. Vol. 39 (2). P. 1627–1637. doi: 10.1007/s11033-011-0902-3.
22. Zhang Y., Martens J.W., Jack X.Y., Jiang J., Sieuwerts A.M., Smid M., Klijn J.G., Wang Y., Foekens J.A. Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69 (9). P. 3795–3801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4596.
7. Cai H., Kumar N., Baudis M. Arraymap: A reference resource for genomic copy number imbalances in human malignancies // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7 (5). E. 36944. doi: 10.1371/journal.pone.0036944.
8. Chin S.F., Teschendorff A.E., Marioni J.C., Wang Y., Barbosa-Morais N.L., Thorne N.P., Costa J.L., Pinder S.E., van De Wiel M.A., Green A.R. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer // *Genome Biol.* 2007. Vol. 8 (10). R. 215.
9. Climent J., Dimitrow P., Fridlyand J., Palacios J., Siebert R., Albertson D.G., Gray J.W., Pinkel D., Lluch A., Martinez-Climent J.A. Deletion of chromosome 11q predicts response to anthracycline-based chemotherapy in early breast cancer // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67 (2). P. 818–826.
10. Goldhirsch A., Winer E., Coates A., Gelber R., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.-J., Albain K.S., André F., Bergh J. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013 // *Ann. Oncol.* 2013. Vol. 24 (9). P. 2206–2223. doi: 10.1093/annonc/mdt303.
11. Han S., Park K., Shin E., Kim H.-J., Kim J.Y., Kim J.Y., Gwak G. Genomic change of chromosome 8 predicts the response to taxane-based neoadjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer // *Oncol. Reports.* 2010. Vol. 24 (1). P. 121–128.
12. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* 2011. Vol. 144 (5). P. 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
13. Horlings H.M., Lai C., Nuyten D.S., Halfwerk H., Kristel P., van Beers E., Joosse S.A., Klijn C., Nederlof P.M., Reinders M.J. Integration of DNA copy number alterations and prognostic gene expression signatures in breast cancer patients // *Clin. Cancer Res.* 2010. Vol. 16 (2). P. 651–663. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0709.
14. Huang N., Shah P.K., Li C. Lessons from a decade of integrating cancer copy number alterations with gene expression profiles // *Brief. Bioinform.* 2012. Vol. 13 (3). P. 305–316. doi: 10.1093/bib/bbr056.
15. Jönsson G., Staaf J., Vallon-Christersson J., Ringnér M., Holm K., Hegardt C., Gunnarsson H., Fagerholm R., Strand C., Agnarsson B.A. Research article Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics // *Breast Cancer Res.* 2010. Vol. 12 (3). R. 42. doi: 10.1186/bcr2596.
16. Kaufmann M., von Minckwitz G., Mamounas E.P., Cameron D., Carey L.A., Cristofanilli M., Denkert C., Eiermann W., Gnant M., Harris J.R. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer // *Ann. Surg. Oncol.* 2012. Vol. 19. P. 1508–1516. doi: 10.1245/s10434-011-2108-2.
17. McClelland S.E., Burrell R.A., Swanton C. Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8 (20). P. 3262–3266.
18. Schwartz G.F., Hortobagyi G.N. Proceedings of the Consensus Conference on Neoadjuvant Chemotherapy in Carcinoma of the Breast, April 26–28, 2003, Philadelphia, Pennsylvania // *Breast J.* 2004. Vol. 10 (4). P. 273–294.
19. Weigman V.J., Chao H.-H., Shabalin A.A., He X., Parker J.S., Nordgard S.H., Grushko T., Huo D., Nwachukwu C., Nobel A. Basal-like Breast cancer DNA copy number losses identify genes involved in genomic instability, response to therapy, and patient survival // *Breast Cancer Res. Treat.* 2012. Vol. 133 (3). P. 865–880. doi: 10.1007/s10549-011-1846-y.
20. Wikman H., Sielaff-Frimpong B., Kropidlowski J., Witzel I., Milde-Langosch K., Sauter G., Westphal M., Lamszus K., Pantel K. Clinical Relevance of Loss of 11p15 in Primary and Metastatic Breast Cancer: Association with Loss of PRKCDP Expression in Brain Metastases // *PLoS ONE.* 2012. Vol. 7 (10). E. 47537. doi: 10.1371/journal.pone.0047537.
21. Xu Y., Duanmu H., Chang Z., Zhang S., Li Z., Li Z., Liu Y., Li K., Qiu F., Li X. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast cancer // *Mol. Biol. Reports.* 2012. Vol. 39 (2). P. 1627–1637. doi: 10.1007/s11033-011-0902-3.
22. Zhang Y., Martens J.W., Jack X.Y., Jiang J., Sieuwerts A.M., Smid M., Klijn J.G., Wang Y., Foekens J.A. Copy number alterations that predict metastatic capability of human breast cancer // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69 (9). P. 3795–3801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4596.

Поступила 21.02.14

REFERENCES

1. Gerashchenko T.S., Denisov E.V., Litvjakov N.V., Zav'jalova M.V., Vtorushin S.V., Cyganov M.M., Perel'muter V.M., Cherdynceva N.V. Intratumoral Heterogeneity: Nature and Biological Significance (review) // *Biohimija.* 2013. Vol. 78 (11). P. 1531–1549. [in Russian]
2. Gervas P.A., Litvjakov N.V., Staheeva M.N., Miller S.V., Dobrodeev A.Ju., Garbukov E.Ju., Babyshkina N.N., Kuharev Ja.V., Vasil'eva M.V., Slonimskaja E.M., Beljavskaja V.A., Tuzikov S.A., Cherdynceva N.V. Influence of apoptosis and repair gene polymorphism on neoadjuvant chemotherapy response of malignant tumors // *Sibirskij onkologicheskij zhurnal.* 2009. № 4 (34). P. 41–47. [in Russian]
3. Cherdynceva N.V., Litvjakov N.V., Denisov E.V. Major advances in basic oncology in 2012 // *Prakticheskaja onkologija.* 2013. Vol. 14 (1). P. 1–12. [in Russian]
4. Bergamaschi A., Kim Y.H., Wang P., Sorlie T., Hernandez-Boussard T., Lonning P.E., Tibshirani R., Børresen-Dale A.L., Pollack J.R. Distinct patterns of DNA copy number alteration are associated with different clinicopathological features and gene-expression subtypes of breast cancer. // *Genes Chromosomes and Cancer.* 2006. Vol. 45 (11). P.1033–1040.
5. Bhatia S., Frangioni J.V., Hoffman R.M. The challenges posed by cancer heterogeneity // *Nat. Biotechnol.* 2012. Vol. 30. P. 604–610. doi: 10.1038/nbt.2294.
6. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T., Grzybowska E., Budryk M., Stawicka M., Mierzwia T., Szwiec M., Wiśniowski R., Siolek M. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy // *J. Clin. Oncol.* 2010. Vol. 28 (3). P. 375–379. doi: 10.1200/JCO.2008.20.7019.