

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ РАКОВО-ТЕСТИКУЛЯРНЫХ АНТИГЕНОВ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Кит О.И.

ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Для поиска эффективных мишеней для иммунотерапии рака молочной железы, на основе раково-тестикулярных антигенов (РТА), необходим анализ ассоциации экспрессии генов РТА с клинико-патологическими характеристиками РМЖ. Поэтому целью нашего исследования стал скрининг РТА, специфичных для опухолевых тканей молочной железы (люминальных типов А и В), на основании анализа их транскрипционного профиля у пациенток разного возраста. Для исследования использовали парные операционные биоптаты (норма и опухоль) тканей молочной железы 32 пациенток (64 образца) в возрасте от 38 до 86 лет. Методом RT-qPCR определяли относительную экспрессию 16 генетических локусов: *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1* и *PRAME1*. Обнаружено, что транскрипционный профиль РТА отличается в разных возрастных группах пациенток: до 55 лет наблюдалась гиперэкспрессия локуса *MAGEA3*, а старше 55 лет – *MAGEA1*, *MAGEB1*, *BAGE*, *NY-ESO1*, *GAGE1* и *GAGE3*. В тканях РМЖ люминального типа А обнаружена повышенная экспрессия РТА-локусов – *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1* и *PRAME1*, а в тканях РМЖ люминального типа В-генов с повышенной экспрессией не обнаружено. Данные отличия необходимо учитывать при планировании иммунотерапии, а также использовать в качестве биомаркеров процессов малигнизации как для РМЖ в целом, так и для его отдельных подтипов.

Ключевые слова: экспрессия генов, Real-Time qPCR, раково-тестикулярные антигены, рак молочной железы, иммунотерапия

TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF CANCER-TESTICULAR ANTIGENS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER

Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Kit O.I.

Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. To identify new effective targets for immunotherapy of breast cancer, based on cancer-testis antigens (CTA), the associations were studied between CTA gene expression, clinical and pathological characteristics of breast cancer. Therefore, the aim of the study was to perform screening of CTAs specific to breast tissue tumors (luminal types A and B) based on assessment of the transcriptional profile of cancer-testis genes in the patients of different ages. To evaluate these relations, paired surgical biopsies (normal and tumor) of breast tissue of 32

Адрес для переписки:

Кутилин Денис Сергеевич
ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ
344037, Россия, г. Ростов-на-Дону, 14 линия, 63, корп. 8.
Тел.: 8 (863) 300-02-00 (доб. 472).
E-mail: k.denees@yandex.ru

Address for correspondence:

Kutilin Denis S.
Rostov Research Institute of Oncology
344037, Russian Federation, Rostov-on-Don,
14th Line, 63, bldg 8.
Phone: 7 (863) 300-02-00 (add. 472).
E-mail: k.denees@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.И. Водолажский, Д.С. Кутилин, Х.А. Могушкова, О.И. Кит «Транскрипционный профиль раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы» // Медицинская иммунология, 2018. Т. 20, № 3. С. 383-390. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390

© Водолажский Д.И. и соавт., 2018

For citation:

D.I. Vodolazhskiy, D.S. Kutilin, Kh.A. Mogushkova, O.I. Kit "Transcriptional profile of cancer-testicular antigens in patients with breast cancer", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2018, Vol. 20, no. 3, pp. 383-390. doi: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390

DOI: 10.15789/1563-0625-2018-3-383-390

patients (64 samples) aged 38–86 years were used. Relative expression of 16 genetic loci (*MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1* and *PRAME1*) was determined by the RT-qPCR. It was found that the transcriptional profile of CTA differs in different age groups of patients (at the age of < 55 years, overexpression of *MAGEA3* was noted; after 55 years, *MAGEA1*, *MAGEB1*, *BAGE*, *NY-ESO1*, *GAGE1* and *GAGE3* were more expressed). In the luminal type A cancer, overexpression of *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1* and *PRAME1*, whereas in B type cancer, the genes with increased expression were not detected. These differences should be considered when planning immunotherapy, can be used as biomarkers for both breast cancer as clinical entity, and, in particular, for its individual subtypes.

Keywords: gene expression, real-time qPCR, cancer-testicular antigens (CTA), breast cancer, immunotherapy

Введение

В мире ежегодно регистрируют приблизительно 1 млн новых случаев заболевания раком молочной железы (РМЖ) [4]. В Российской Федерации рак молочной железы является самым распространенным злокачественным новообразованием у женщин: в 2013 году было выявлено 57 307 новых случаев заболевания, а число умерших составило более 20 000 пациентов [2]. Рак молочной железы – гетерогенное заболевание, включающее в себя как наследственные, так и спорадические формы [5].

Прогнозирование развития рецидивов и метастазирования РМЖ после первичного лечения представляет собой серьезную и нерешенную проблему [7]. Одним из возможных подходов к профилактике метастазирования и рецидивов онкологических заболеваний, в том числе РМЖ, является иммунотерапия. В настоящее время иммунотерапевтические курсы при РМЖ чаще используются при лечении онкологических заболеваний на поздней стадии развития и в основном направлены на антигены, экспрессирующиеся немалигнизированными клетками и сверх-экспрессирующиеся раковыми клетками [11]: MUC1, раково-эмбриональный антиген (CEA) и HER2 и др. [1]. Иммунотерапия РМЖ, направленная на раково-тестикулярные антигены (РТА), может быть более специфичной и поэтому намного более эффективной, чем на вышеперечисленные опухолевые антигены. Иммунный ответ может быть стимулирован адьювантами, эпигенетическими (деметирующими) препаратами и анти-CTLA-4-терапией. Результаты анализа базы данных клинических испытаний www.clinicaltrials.gov показали, что до настоящего времени было проведено небольшое количество испытаний вакцин, направленных на РТА: MAGE-A12 с адьювантом Montanide ISA-51, NY-ESO-1 – CNP-NY-ESO-1 с иммуноадьювантом OK-432, NY-ESO-1 – CDX-1401 в комбинации с Resiquimod и/или poly-ICLC (Hiltonol) [8]. Таким образом, иммунотерапевтические подходы, направленные на РТА при РМЖ, находятся в начальной стадии разработок.

В рутинной клинической практике выбор лечебных воздействий основан на стандартных

прогностических факторах: возраст, наступление менопаузы, размер опухоли, степень ее злокачественности, рецепторный статус стероидных гормонов и HER2/neu, мутационный статус генов *BRCA 1/2*, наличие/отсутствие метастазов в локальных лимфатических узлах. Однако стандартные подходы не всегда способны эффективно предсказать оптимальный терапевтический подход для лечения заболевания. Для некоторых раково-тестикулярных антигенов в результате многочисленных исследований было выявлено их прогностическое значение, которое может быть использовано для уточняющей диагностики РМЖ [1, 9, 14, 15, 16, 19].

В нескольких исследованиях по РМЖ было доказано, что частота экспрессии РТ-антигенов (РТА) выше в низкодифференцированных опухолях [14], а в исследовании Grigoriadis A. и соавт. [12] было обнаружено, что РТА разных классов (СТ-Х, non-Х) по-разному экспрессируются в разных подгруппах опухолей молочной железы. Однако исследования РТ-генов и РТА в основном ограничены семействами MAGE-A и NY-ESO-1. Следовательно, анализ ассоциации экспрессии других РТ-генов в РМЖ с клинико-патологическими характеристиками необходим для идентификации новых, более специфичных маркеров прогрессии РМЖ и мишеней для иммунотерапии.

Целью нашего исследования стал скрининг РТА, специфичных для опухолевых тканей молочной железы (люминальных типов А и В) на основании анализа паттерна транскрипционных профилей раково-тестикулярных генов у пациенток с РМЖ разного возраста.

Материалы и методы

В исследовании использованы парные операционные биоптаты 32 пациенток (64 образца) в возрасте от 38 до 86 лет, поступивших на лечение в ФГБУ РНИОИ МЗ РФ в 2015–2017 гг.: прилегающие к опухоли немалигнизированные (норма) и собственно опухолевые ткани молочной железы. Образцы для транспортировки в лабораторию и хранения мгновенно замораживали в жидком азоте без использования крио-/транспортных РНК-сред. Максимальное время

от взятия образца до его заморозки в жидком азоте составляло не более 20 с. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБУ РНИОИ; в каждом конкретном случае было получено информированное согласие больного на включение его в данное исследование.

Фрагменты ткани измельчали и растирали в фарфоровых ступках в лизирующем растворе, содержащем 4 М гуанидин тиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,5% саркозили и 0,1 М 2-меркаптоэтанол. Дальнейшее выделение РНК из тканей проводили по методу Р. Chomczynski и N. Sacchi [10]. Для удаления следов геномной ДНК полученные образцы суммарной РНК обрабатывали препаратами ДНК-азы. Синтез кДНК проводили с использованием коммерческих наборов Reverta-L («Интерлабсервис», Россия). Методом RT-qPCR определяли величины относительной экспрессии 16 генетических локусов: *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE1*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1*, *BAGE*, *XAGE3*, *NY-ESO1*, *SSX2*, *SYCP1* и *PRAME1*. В качестве референсного использовали ген *GAPDH*. Дизайн специфичных олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) осуществлялся нами с использованием референсных последовательностей NCBI GenBank и программы Primer-BLAST на основе следующих принципов: область отжига олигонуклеотидных праймеров должна быть в диапазоне 58-60 °С; GC-состав в диапазоне 40-60%; в последовательности прай-

мера должны отсутствовать стабильные вторичные структуры – шпильки и димеры, e-value последовательности праймера должно стремиться к нулю и быть не больше 0,05, а query coverage (покрытие целевой последовательности) 100% (для версии BLASTN 2.3.1+), температуры отжига праймеров (Forward и Reverse) не должны различаться друг от друга более чем на 0,50. При подборе праймеров учитывался сплайсинг мРНК (использовали опцию "Primer must span an exon-exon junction" программы Primer-BLAST) [3].

Полученную библиотеку кДНК амплифицировали в 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей 12 нг кДНК, 0,25 мМ каждого из dNTP, 2,5 мМ MgCl₂, 1х-ый ПЦР-буфер и 1 ед. акт. SynTaq ДНК-полимеразы с ингибирующими активностью фермента антителами («Синтол», Россия), краситель EVA-Green и по 400 нМ прямого и обратного праймеров для референсного гена (*GAPDH*) или гена-мишени. Количественную RT-PCR-амплификацию проводили на термоциклере Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США) по следующей программе: первичная денатурация: t = 95 °С в течение 3 мин; 40 циклов: t = 95 °С в течение 10 с, t = 58 °С в течение 30 с (регистрация сигнала), t = 72 °С в течение 30 с. Относительную экспрессию генетического локуса (RE) рассчитывали по формуле $RE = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ [3, 17]. Нормализацию проводили по референсному гену *GAPDH* и экспрессии соответствующих генов в образцах

ТАБЛИЦА 1. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СПЕЦИФИЧНЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ

TABLE 1. SPECIFIC OLIGONUCLEOTIDE PRIMER SEQUENCES USED IN THIS STUDY

№	Название генетического Локуса Locus name	Последовательности праймеров 5'→3' Primer sequences 5'→3'	
		Прямой Sense	Обратный Antisense
1	<i>MAGEA1</i>	GAAGGAACCTGACCCAGGC	AGGGAATCCTGTCCTCTGGG
2	<i>MAGEA2</i>	CGCAGGCTCCGTGAGG	CTGTGTTGACCTGAGTCACCT
3	<i>MAGEA3</i>	TGAGCAACGAGCGACGG	TCAGCCTGTCCCCTCAGAA
4	<i>MAGEB1</i>	TTCAGTGTGGTGTCCAGCAG	CGAGTTGTA CTCTGGATGATCT
5	<i>MAGEB2</i>	AGCCAGGGGTGAATTCTCAG	GGCACGGAGCTTACTCTTCT
6	<i>GAGE-1</i>	CTGATGGGCAGGAGATGGAC	CCAGTCTGGGCAACATAGTGA
7	<i>GAGE3</i>	TCACACAGATGAGTTGGCGA	CTGTGTGAAATATGAGTTGGCGA
8	<i>GAGE4</i>	GAGGAGGTGAAAACGCCTGA	GCATCATTTCAACGTGCCTTCT
9	<i>MAGEC1</i>	ACGAGGATCGTCTCAGGTCA	CCAGGTCTTCAACTCCTGCT
10	<i>MAGEA4</i>	CTGACCAGCAGCTTGGGAT	TCCAGGGAATCCTGTCTCTCC
11	<i>BAGE</i>	GCCGGCTCCTTTCAGGATT	ACATCTTTCAGGAGCTTGGTCA
12	<i>NY-ESO1</i>	TCACTGTGTCCGGCAACATA	TGATGGAGAGCTGCAGTTGG
13	<i>XAGE3</i>	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCCG	ACTTGCCCTGAGACTTAGTTCCG
14	<i>SSX2</i>	CACGGTTGGTGCTCAAATACC	CCGAGGCTTTCATCTTTTCCC
15	<i>SYCP1</i>	CGGTGAAACCTCAGACCCT	AGTCTTTGCAAATGGAAACTCAAA
16	<i>PRAME1</i>	GCTGAGCCATTGTCTCGTTC	AGGTCTCAGTCACTTGTGGCC
17	<i>GAPDH</i>	GTCAGGCTGAGAACGGGAA	TCGCCCCACTTGATTTTGGGA

нормальной ткани, последовательно по схеме, приведенной ниже:

1. Нормализация по референсному гену:
 $\Delta C(t) = C(t)_{\text{target}} - C(t)_{\text{reference}}$

2. Расчет медианы $\Delta C(t)$ по каждому гену для контрольной (условно нормальной) и опытной (опухолевой) групп.

3. Нормализация по контрольной группе:
 $\Delta \Delta C(t) = \Delta C(t)_{\text{Медиана опытной группы}} - \Delta C(t)_{\text{Медиана контрольной группы}}$

4. Окончательный результат (кратное различие): $2^{-\Delta \Delta C(t)}$ [3].

Статистический анализ результатов выполняли с использованием пакета прикладных статистических программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Статистическую значимость различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий отвергали при $p < 0,05$.

Для проведения статистического анализа пациентки были разбиты на следующие независимые группы:

1) группа А(1) – пациентки с возрастом до 55 лет (медиана возраста 45 лет, $n = 18$) и группу Б(2) – пациентки с возрастом старше 55 лет (медиана возраста 68 лет, $n = 14$);

2) группа пациенток В (3) с гистологически подтвержденным диагнозом РМЖ люминального типа А (16 пациенток) и группа Г(4) – пациентки с люминального типа В (16 пациенток).

Статистический анализ проводили с использованием критерия Манна–Уитни.

Результаты

В ходе проведенного исследования обнаружено статистически достоверное ($p < 0,005$) увеличение транскрипционной активности генов РТА *MAGEA3* в 2,7 раза (у 65% пациентов), *MAGEA4* в 2,7 раза (у 41% пациентов) и *GAGE3* в 2,9 раза (у 57% пациентов) в опухолевой ткани молочной железы относительно нормальной ткани у пациенток объединенной группы ($n = 32$, рис. 1).

Следующие результаты были получены при разделении общей группы пациенток в зависимости от возраста на две группы: группа А – пациентки не старше 55 лет (пременопаузальная группа, медиана возраста 45 лет, $n = 18$) и группа Б – пациентки старше 55 лет (постменопаузальная группа, медиана возраста 68 лет, $n = 14$). В группе А наблюдалось статистически достоверное увеличение экспрессии гена *MAGEA3* в 2,8 раза ($p < 0,05$, у 60% пациентов), в группе Б – достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов *MAGEA1*, *MAGEB1*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE* и *NY-ESO1* в 6,0 (у 75% пациентов), 3,2 (у 65% пациентов), 4,3 (у 75% пациентов), 9,9 (у 75% пациентов), 1,6 (у 63% пациентов) и в 4,0 (у 75% пациентов) раза, соответственно, в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью молочной железы (рис. 2).

При сравнении пациенток с РМЖ люминальных типов А и В были получены следующие результаты:

1) у пациенток с РМЖ люминального типа А обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение экспрессии генов РТА *MAGEA1* в 6,2 раза, *MAGEA2* в 3,5 раза, *MAGEA4*

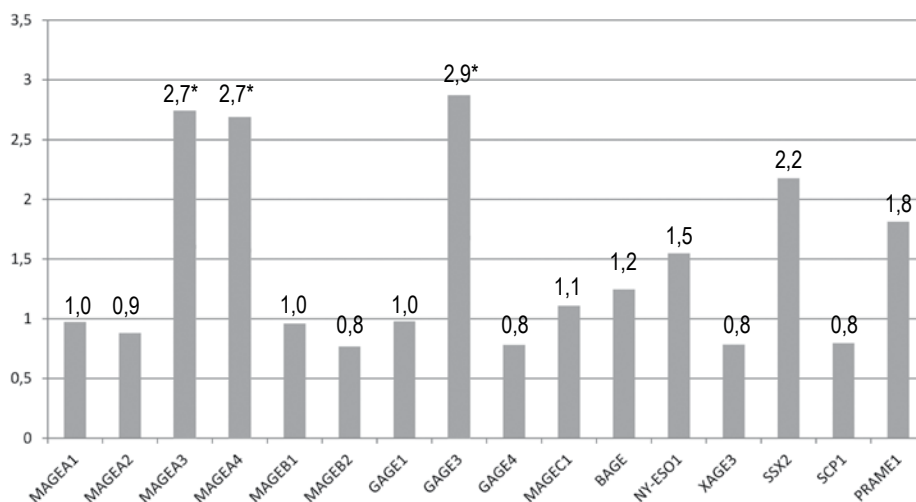


Рисунок 1. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани относительно нормальной у пациенток в возрасте 38-86 лет ($n = 32$)

Примечание. * – статистически достоверные ($p < 0,005$) отличия.

Figure 1. The CTA gene expression ratio in tumor tissue relative to normal tissue in patients aged 38-86 years ($n = 32$)

Note. *, statistically significant differences ($p < 0.005$).

в 14,9 раза, *MAGEB1* в 15,0 раза, *MAGEB2* в 4,1 раза, *GAGE3* в 36,2 раза, *GAGE4* в 8,5 раза, *MAGEC1* в 9,7 раза и *PRAME1* в 30,4 раза в опухолевой ткани относительно нормальной ткани (рис. 3А);

2) у пациенток с РМЖ люминального типа В обнаружено статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение транскрипционной активности генов РТА *MAGEB2* и *GAGE4* в 8,0 и 3,0 раза, соответственно, в опухолевой ткани относительно нормальной ткани. Достоверного изменения экспрессии других РТА генов не обнаружено (рис. 3Б).

Обсуждение

В объединенной группе пациенток с РМЖ обнаружена статистически значимая гиперэкспрес-

сия только 3 из 16 исследованных генетических локусов: *MAGEA3*, *MAGEA4* и *GAGE3*, причем у 22% пациенток наблюдается одновременная гиперэкспрессия этих локусов, у 16% – только гиперэкспрессия *MAGEA3* и *GAGE3*, у 6% – только *GAGE3*, у 16% – только *MAGEA4*, у 11% – только *MAGEA3*, а у 29% пациенток экспрессия не одного из этих локусов не повышена. Следует отметить, что данные по гиперэкспрессии генов семейства *MAGEA* и *GAGE* при РМЖ подтверждаются в литературных источниках [1, 12, 16].

У пациенток разных возрастных групп обнаружен дифференциальный профиль экспрессии генетических локусов РТА, причем для возрастной группы пациенток до 55 лет характерно увеличение транскрипционной активности только

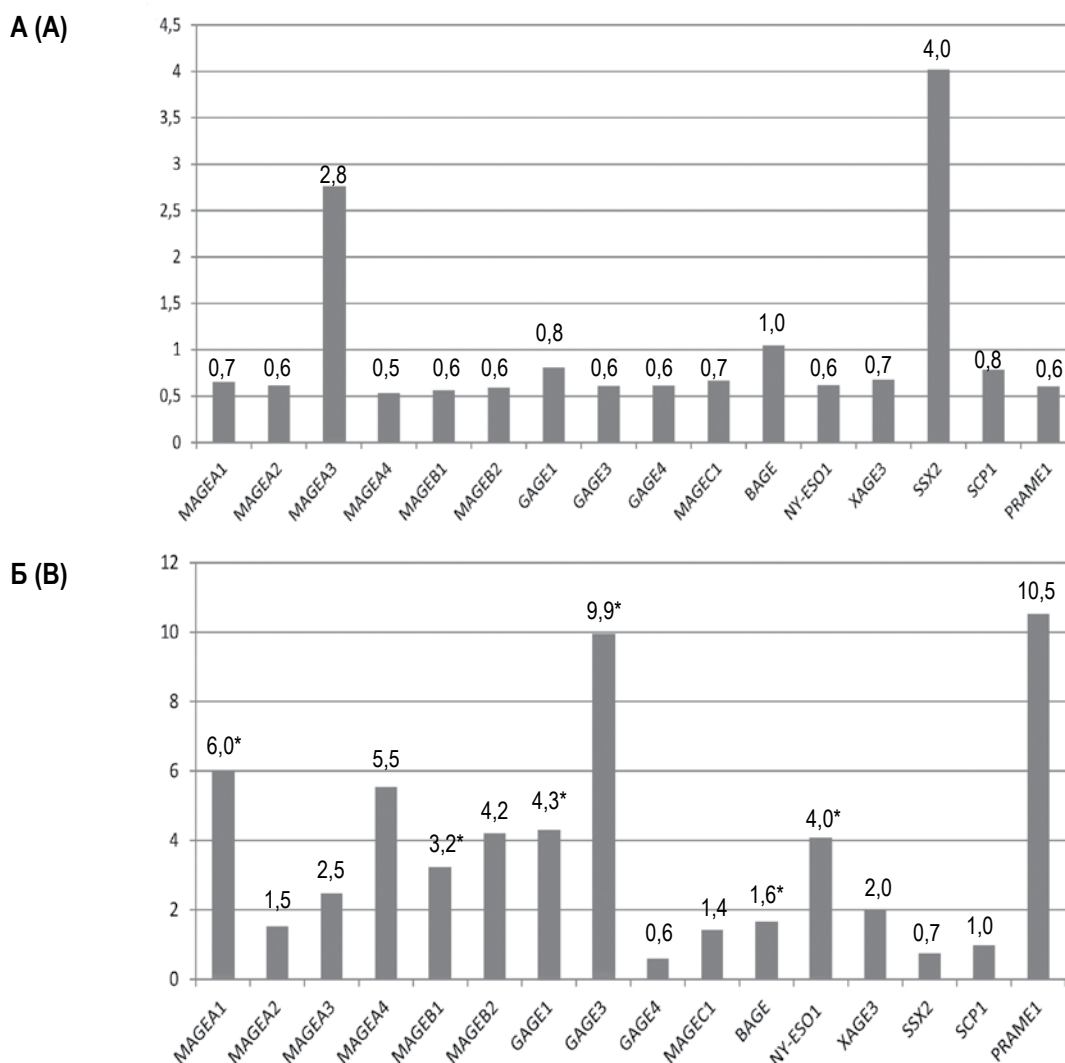


Рисунок 2. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани по сравнению с нормальной тканью у пациенток: (А) не старше 55 лет (медиана возраста 45 лет, n = 18), (Б) старше 55 лет (медиана возраста 68 лет, n = 14)

Примечание. * – статистически достоверные ($p < 0,05$) отличия.

Figure 2. The CTA gene expression ratio when comparing tumor tissue with normal tissue in patients: (A) under 55 years old (median age = 45 years, n = 18), (B) older than 55 years (median age = 68 years, n = 14)

Note. *, statistically significant differences ($p < 0.05$).

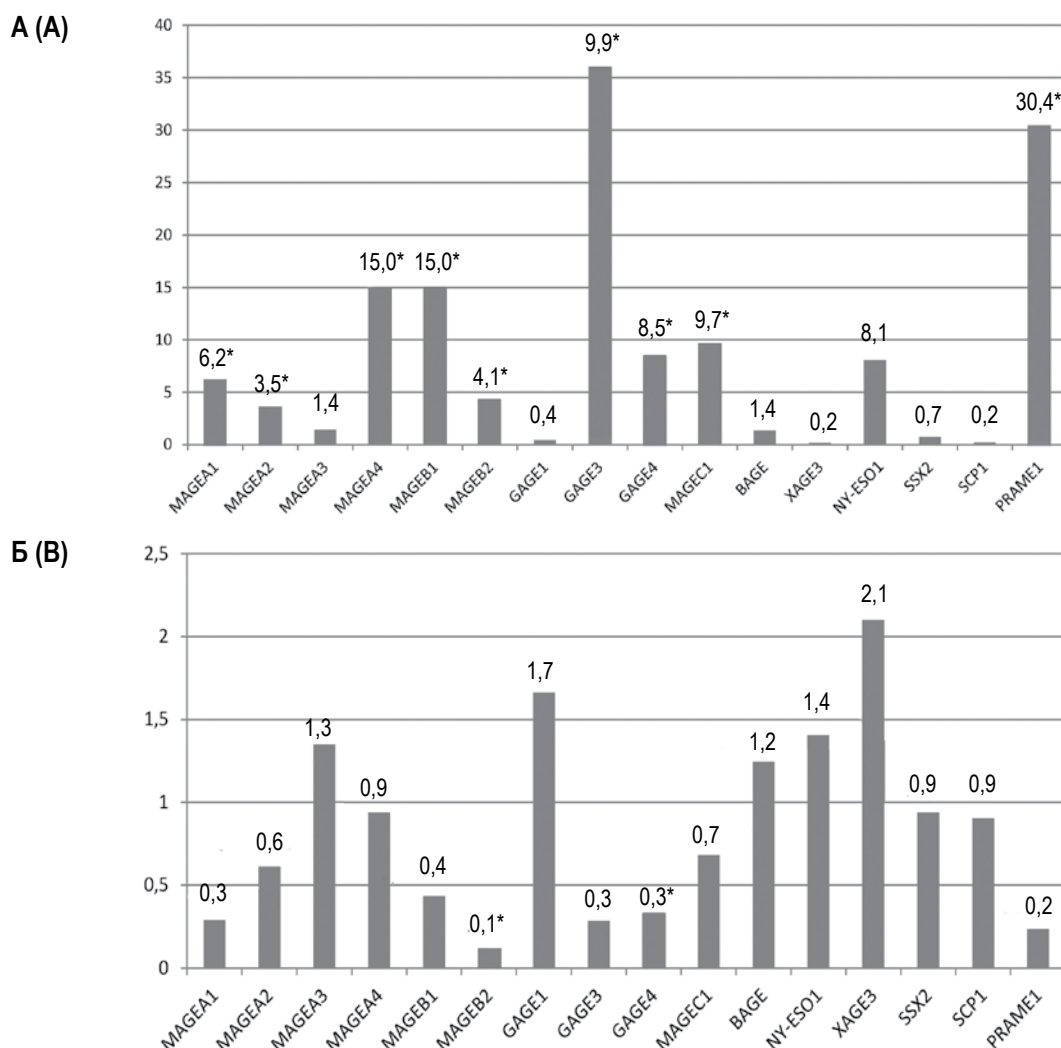


Рисунок 3. Соотношение экспрессии генов РТА в опухолевой ткани относительно нормальной у пациенток РМЖ: (А) люминального типа А (n = 16), (Б) люминального типа В (n = 16)

Примечание. * – статистически достоверные ($p < 0.05$) отличия.

Figure 3. The CTA gene expression ratio in tumor tissue compared to normal tissue in patients with breast cancer: A) luminal type A (n = 16), B) luminal type B (n = 16)

Note. *, statistically significant differences ($p < 0.05$).

1 локуса *MAGEA3*, относящегося к классу СТ-Х и тестикулярно-селективных РТА, а в группе пациенток старше 55 лет – 6 локусов (*MAGEA1*, *MAGEB1*, *GAGE1*, *GAGE3*, *BAGE* и *NY-ESO1*), относящихся как к классам СТ-Х и non-X, так и к тестикулярно-селективным и тестикулярно-ограниченным РТА. Обращает на себя внимание, что паттерны экспрессии РТА-локусов не совпадают при сравнении этих двух групп, и амплитуда отношения транскрипционной активности между опухолевой тканью и прилегающей к ней немалигнизированной тканью (условная норма) в группе пациенток старше 55 лет выражены значительно сильнее. Наличие возрастных особенностей в профиле экспрессии РТА можно объяснить изменением гормонального статуса пациенток после 55 лет (постменопаузальный период), а также использованием в исследовании

опухолей молочной железы двух типов люминального А и В, экспрессирующих, соответственно, выражено и умеренно рецепторы эстрогена.

Основываясь на данных, представленных в исследованиях Theurillat J.-P. и соавт. [19], Grigoriadis A. и соавт. [12], Sugita Y. и соавт. [18], Nama A. и соавт. [13] о связи экспрессии генов некоторых РТА (например, NY-ESO-1, MAGE-A3 и MAGE-A6) со статусом опухоли по наличию эстрогеновых рецепторов и рецепторов HER2/neu, интересно оценить значимую ассоциацию экспрессии более широкого спектра генов РТА с клинико-патологическими характеристиками не РМЖ в целом, а некоторых подгрупп РМЖ, в частности HER2-позитивных и HER2-негативных.

Сегодня выделяют две большие группы опухолей молочной железы, происходящие, соот-

ветственно, из базального (миоэпителиального) и люминального эпителия, которые можно отличить друг от друга по экспрессии специфических цитокератинов. Создана молекулярная классификация, согласно которой выделяют варианты РМЖ, различающиеся по прогнозу и чувствительности к различным видам лекарственной терапии [6]. Внутри люминальной подгруппы выделяют два варианта – люминальный А, наиболее прогностически благоприятный, и люминальный В, который примерно в 30% случаев является HER2-позитивным, оставшиеся 70% случаев люминального В РМЖ, имея формальные признаки люминального А варианта (т.е. ER(+) и/или PgR(+)/HER2/neu(-)) отличаются от него высоким пролиферативным потенциалом и в силу этого характеризуются неблагоприятным прогнозом, мало отличающимся от HER2(-) и тройного негативного вариантов.

В нашем исследовании опухоли люминального типа В в 100% случаев экспрессировали HER2/NEU (но в разной степени). Полученные нами закономерности в изменении транскрипционной активности РТА-локусов двух групп пациенток с люминальным А и люминальным В типом хорошо согласуются с прогнозом развития заболевания. В отличие от опухолей люминального типа А у опухолей люминального типа В не наблюдалось существенного увеличения транскрипционной активности исследованных РТА-локусов, что свидетельствует об их низком иммунотерапевтическом потенциале при лечении РМЖ данного типа. А достоверное снижение экспрессии генов *MAGEB2* и *GAGE4* может служить диагностическим маркером РМЖ люминального типа В, так же как и увеличение экспрессии 9 локусов при РМЖ люминального типа В.

Следует отметить, что часто используемый в качестве мишени для иммунотерапии *NY-ESO1*

в нашем исследовании показал повышенную экспрессию только у группы пациенток старше 55 лет. А анализ данных базы BioGPS (<http://ds.biogps.org/?dataset=GSE1133&gene=1485>) показал, что уровень экспрессии мРНК *NY-ESO1* (*CTAG1B*) достаточно высок в различных органах и тканях (например, сердечной мышце). Все это в совокупности может свидетельствовать о низкой эффективности и потенциально нежелательных системных эффектах подобной терапии.

Заключение

Обнаруженное увеличение экспрессии генов *MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA3*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *BAGE*, *NY-ESO1*, *GAGE1*, *MAGEC1*, *PRAME1*, *GAGE4* и *GAGE3* создает предпосылки для использования этих РТА в качестве наиболее эффективных мишеней при иммунотерапии РМЖ. Но для разных возрастных групп пациенток в качестве такой мишени выступают разные группы РТА: для пациенток до 55 лет – *MAGEA3*, для пациенток старше 55 лет – *MAGEA1*, *MAGEB1*, *BAGE*, *NY-ESO1*, *GAGE1* и *GAGE3*, так же как и для люминального типа А (*MAGEA1*, *MAGEA2*, *MAGEA4*, *MAGEB1*, *MAGEB2*, *GAGE3*, *GAGE4*, *MAGEC1* и *PRAME1*) и В (локусов с повышенной экспрессией не обнаружено).

Данные отличия транскрипционного профиля РТА, ассоциированные с возрастом и люминальным А/В типом РМЖ, необходимо учитывать при планировании и проведении иммунотерапии. Исходя из полученных нами данных, можно сделать предположение, что наибольшую экспрессию РТА-локусов будет проявлять группа пациенток старше 55 лет с люминальным типом А опухоли. Следовательно, именно эта группа пациенток должна иметь наилучший прогноз при терапии РМЖ с использованием дендритно-клеточных вакцин, ориентированных на эти РТА.

Список литературы / References

1. Водолажский Д.И., Кутилин Д.С., Могушкова Х.А., Ващенко Л.Н., Никитина В.П., Кит О.И. Транскрипционная активность раково-тестикулярных антигенов у больных раком молочной железы люминальных подтипов А и В // Современные проблемы науки и образования, 2017. № 4. [Vodolazhskiy D.I., Kutilin D.S., Mogushkova Kh.A., Vashchenko L.N., Nikitina V.P., Kit O.I. Transcriptional activity of cancer-testis antigens in patients with breast cancer of luminal subtypes A and B. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern Problems of Science and Education*, 2017, no. 4. (In Russ.)]
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2013 году. М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2014. 236 с. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Status of cancer care for the population of Russia in 2013]. Moscow: MNIOI them. P.A. Herzen, Ministry of Health and Social Development of Russia, 2014. 236 p.
3. Кутилин Д.С., Димитриади С.Н., Водолажский Д.И., Франциянц Е.М., Кит О.И. Влияние тепловой ишемии-реперфузии на экспрессию апоптоз-регулирующих генов в почечной ткани больных с почечно-клеточным раком // Нефрология, 2017. № 21 (1). С. 80-86. [Kutilin D.S., Dimitriadi S.N., Vodolazhskiy D.I., Frantsiyants E.M., Kit O.I. Effect of thermal ischemia-reperfusion on expression of apoptosis-regulating genes in the renal tissue of patients with renal cell carcinoma. *Nefrologiya = Nephrology (St. Petersburg)*, 2017, no. 21 (1), pp. 80-86. (In Russ.)]
4. Пак Д.Д., Усов Ф.Н., Фетисова Е.Ю., Волченко А.А., Ефанов В.В. Современные подходы к лечению больных с карциномой *in situ* молочной железы // Онкология, 2013. № 4. С. 34-39. [Pak D.D., Usov F.N., Fetisova E.Yu., Volchenko A.A., Efanov V.V. Current treatment options for breast carcinoma *in situ*. *Onkologiya = Herzen Journal of Oncology*, 2013, no. 4, pp. 34-39. (In Russ.)]
5. Пржедецкий Ю.В., Водолажский Д.И., Шатова Ю.С., Комова Е.А., Двадненко К.В. BRCA-мутации у больных с клиническими признаками наследственного рака молочной железы в Южном федеральном округе // Злокачественные

опухоли, 2015. Т. 16, № 4-2. С.196-197. [Przedetskiy Yu.V., Vodolazhskiy D.I., Shatova Yu.S., Komova E.A., Dvadenko K.V. In the RCA mutation in patients with clinical signs of hereditary breast cancer in the Southern Federal District. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors*, 2015, Vol. 16, no. 4-2, pp. 196-197. (In Russ.)]

6. Стенина М.Б., Фролова М.А. Рак молочной железы: наиболее важные научные события и выводы последних лет // Практическая онкология, 2011. № 12 (1). С. 6-11. [Stenina M.B., Frolova M.A. Breast cancer: the most important scientific events and conclusions of recent years. *Prakticheskaya onkologiya = Practical Oncology*, 2011, no. 12 (1), pp. 6-11. (In Russ.)]

7. Ahmad A. Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN Oncol.*, 2013, pp. 1-16.

8. Aoki M., Ueda S., Nishikawa H., Kitano S., Hirayama M., Ikeda H., Toyoda H., Tanaka K., Kanai M., Takabayashi A., Imai H., Shiraishi T., Sato E., Wada H., Nakayama E., Takei Y., Katayama N., Shiku H., Kageyama S. Antibody responses against NY-ESO-1 and HER2 antigens in patients vaccinated with combinations of cholesteryl pullulan (CHP)-NY-ESO-1 and CHP-HER2 with OK-432. *Vaccine*, 2009, no. 49, pp. 6854-6861.

9. Bandic D., Juretic A., Sarcevic B., Separovic V., Kujundzic-Tiljak M., Hudolin T., Spagnoli G.C., Covic D., Samija M. Expression and possible prognostic role of MAGE-A4, NY-ESO-1, and HER-2 antigens in women with relapsing invasive ductal breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat. Med. J.*, 2006, no. 1, pp. 32-41.

10. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 2006, no. 2, pp. 581-585.

11. Curigliano G., Locatelli M., Fumagalli L., Goldhirsch A. Immunizing against breast cancer: a new swing for an old sword. *Breast*, 2009, no. 18, pp. 951-954.

12. Grigoriadis A., Caballero O.L., Hoek K.S., da Silva L., Chen Y.T., Shin S.J., Jungbluth A.A., Miller L.D., Clouston D., Cebon J., Old L.J., Lakhani S.R., Simpson A.J., Neville A.M. CT-X antigen expression in human breast cancer. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 2009, no. 32, pp. 13493-13498.

13. Hamai A., Duperrier-Amouriaux K., Pignon P., Raimbaud I., Memeo L., Colarossi C., Canzonieri V., Perin T., Classe J.M., Campone M., Jezequel P., Campion L., Ayyoub M., Valmori D. Antibody responses to NY-ESO-1 in primary breast cancer identify a subtype target for immunotherapy. *PLoS ONE*, 2011, no. 6, e21129. doi: 10.1371/journal.pone.0021129.

14. Kavalari R., Sarcevic B., Spagnoli G.C., Separovic V., Samija M., Terracciano L., Heberer M., Juretic A. Expression of MAGE tumour-associated antigens is inversely correlated with tumour differentiation in invasive ductal breast cancers: an immunohistochemical study. *Virchows Arch.*, 2001, Vol. 439, no. 2, pp. 127-131.

15. Kruger S., Ola V., Feller A.C., Fischer D., Friedrich M. Expression of cancer-testis antigen CT7 (MAGE-C1) in breast cancer: an immunohistochemical study with emphasis on prognostic utility. *Pathol. Oncol. Res.*, 2007, no. 2, pp. 91-96.

16. Matkovic B., Juretic A., Spagnoli G.C., Separovic V., Gamulin M., Separovic R., Saric N., Basic-Koretic M., Novosel I., Kruslin B. Expression of MAGE-A and NY-ESO-1 cancer/testis antigens in medullary breast cancer: retrospective immunohistochemical study. *Croat. Med. J.*, 2011, no. 2, pp. 171-177.

17. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 2008, no. 3, pp. 1101-1108.

18. Sugita Y., Wada H., Fujita S., Nakata T., Sato S., Noguchi Y., Jungbluth A.A., Yamaguchi M., Chen Y.T., Stockert E., Gnjjatic S., Williamson B., Scanlan M.J., Ono T., Sakita I., Yasui M., Miyoshi Y., Tamaki Y., Matsuura N., Noguchi S., Old L.J., Nakayama E., Monden M. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in malignant and benign breast tumors. *Cancer Research*, 2004, no. 6, pp. 2199-2204.

19. Theurillat J.P., Ingold F., Frei C., Zippelius A., Varga Z., Seifert B., Chen Y.T., Jager D., Knuth A., Moch H. NY-ESO-1 protein expression in primary breast carcinoma and metastases: correlation with CD8⁺ T-cell and CD79a⁺ plasmacytic/B-cell infiltration. *Int. J. Cancer*, 2007, no. 11, pp. 2411-2417.

Авторы:

Водолажский Д.И. — к.б.н., руководитель лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Кутилин Д.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Могущкова Х.А. — аспирант ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Кит О.И. — д.м.н., профессор, генеральный директор ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Authors:

Vodolazhskiy D.I., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kutulin D.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Oncology, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Mogushkova Kh.A., Research Fellow, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Kit O.I., PhD, MD (Medicine), Professor, General Director, Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russian Federation

Поступила 14.09.2017

Принята к печати 25.09.2017

Received 14.09.2017

Accepted 25.09.2017