

ОБЗОРЫ

УДК 616.006-618.19

© Коллектив авторов

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

С.Н. Тамкович^{1,2}, В.Е. Войцицкий³, П.П. Лактионов¹*

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, 8; тел.: (383)363-51-44;
факс: (383)363-51-53; эл. почта: s.tamk@niboch.nsc.ru

²Новосибирский национальный исследовательский государственный
университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2; тел.: (383)363-51-44;
факс: (383)363-41-92

³Новосибирский областной онкологический диспансер, 630108, Новосибирск,
ул. Плеханова, 2; тел./факс: (383)301-31-51

В представленном обзоре систематизированы литературные данные об используемых в настоящее время инструментальных, цитологических и молекулярных (метаболических, протеомных, генетических и эпигенетических) методах в ранней диагностике рака молочной железы. Оценены аналитические возможности и перспективы использования этих методов в практической медицине.

Ключевые слова: рак молочной железы, онкомаркеры, циркулирующие нуклеиновые кислоты, ранняя диагностика рака.

ВВЕДЕНИЕ. Злокачественные новообразования молочной железы занимают лидирующее место в структуре онкологических заболеваний женщин. По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) ежегодно в мире выявляется более 1,38 млн. новых случаев рака молочной железы и 460 тысяч смертей от него [1]. В России рак молочной железы также занимает первое место по показателям заболеваемости (20%) и смертности (17,3%) среди злокачественных заболеваний женщин в возрасте 40-85 лет [2].

Проблема своевременного выявления рака молочной железы заключается не только в его бессимптомном развитии, но и в отсутствии надёжных маркёров, способствующих раннему выявлению неопластического процесса. По статистике, 80% больных сами случайно обнаруживают у себя опухоль, которая в половине случаев относится к распространенной стадии. Большинство больных выявляют на индивидуальных профилактических осмотрах врачи разных специальностей, значительно меньше – при проведении массовых профосмотров [3]. К сожалению, небольшие опухоли до 2 см и расположенные глубоко в ткани молочной железы практически не поддаются клинической диагностике [3].

* - адресат для переписки

Современным трендом в развитие диагностики РМЖ является разработка неинвазивных/малоинвазивных диагностических процедур. К их числу в первую очередь относятся различные инструментальные (маммография, УЗИ, МРТ, ПЭТ) методы анализа. Инструментальный контроль используется и для повышения эффективности биопсии. Современное диагностическое использование методов молекулярного анализа так же в первую очередь ориентировано на неинвазивный анализ - анализ биологических жидкостей, и, в первую очередь циркулирующей крови. Действительно, такой анализ не требует материала, полученного непосредственно из опухолевой ткани, а значит, не зависит от локализации/выявления опухоли, подразумевает раннее выявление первичных опухолей или вторичных очагов, и востребован современной диагностической медициной. Представленный обзор посвящен анализу современных трендов в диагностике РМЖ.

1. ИНСТРУМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ.

Основным современным методом диагностики злокачественных новообразований молочной железы является маммография, позволяющая с достоверностью от 80 до 96% выявить новообразования молочной железы размером более 10 мм в диаметре. Скрининговая маммография проводится ежегодно с профилактической целью всем женщинам старше 40 лет, однако, несмотря на высокую эффективность, имеет ряд существенных недостатков. Например, получаемые дозы облучения не позволяют использовать рентгенологический метод для динамического наблюдения. Кроме того, маммография не даёт возможности дифференцировать кистозные и солидные образования; она менее чувствительна для обнаружения рака *in situ* [4], инвазивных лобулярных карцином и диффузных опухолей [5]. К другим недостаткам рентгенологического метода можно отнести низкую выявляемость пальпируемых злокачественных новообразований (до 40% ложноотрицательных результатов) у молодых женщин, что объясняется большей плотностью молочной железы и, как следствие, меньшей вероятностью обнаружения мелких и плотных очагов роста новообразования [6]. Более того, каждая вторая женщина, ежегодно проходящая маммографию, получает как минимум один ложноположительный результат в своей жизни, что приводит к нежелательной биопсии и тревоге.

Наиболее широкое распространение у молодых женщин в возрасте до 35 лет получил метод УЗИ (ультразвукового исследования), способный отличить более плотную ткань опухоли от окружающей нормальной ткани. Однако в процессе диагностики участки жировой инволюции могут быть ошибочно приняты за патологические структуры, что увеличивает риск получения ложноположительных результатов, а ложноотрицательные результаты могут быть связаны с тем, что не все формы злокачественных новообразований молочной железы визуализируются этим методом. Кроме того, методом УЗИ невозможно выявлять микрокальцинаты, которые встречаются при раке в 42-50% случаев. При проведении ультразвукового сканирования молочных желез 10000 пациенток с доброкачественными и злокачественными новообразованиями, чувствительность УЗИ в выявлении рака составила 92%, специфичность метода – 65%. Показано, что чувствительность метода была прямо пропорциональна размеру выявляемого очага и обратно пропорциональна количеству жировой ткани в молочной железе [5]. Считается, что ложноотрицательные результаты ранних опухолей молочной железы при УЗИ могут достигать 60% [3, 6]. Получившая широкое распространение

в последнее время, соноэластография позволяет в режиме реального времени сравнивать эхо-сигнал, получаемый от участка ткани при нагрузке (мягкое давление, осуществляемое стандартным ультразвуковым датчиком) и без неё. Благодаря определению индекса жесткости/эластичности новый метод имеет более привлекательные аналитические характеристики по сравнению с классическим эхо-сканированием, более успешно дифференцируя маленькие злокачественные и доброкачественные новообразования (чувствительность 75%, специфичность 81%) [7]. Показано, что этот метод является достоверно более чувствительным по сравнению с маммографией при выявлении рака молочной железы на фоне кистозной формы мастопатии: 93% против 40% (при размере новообразования более 20 мм) [8]. К недостаткам всех типов эхо-сканирований можно причислить зависимость интерпретации результатов от опыта врача и субъективность трактовки результатов.

Одним из новых неинвазивных методов обследования молочных желез является магнитно-резонансная томография (МРТ). Наиболее часто для обследования молочных желез используются высокопольные МР-томографы, позволяющие дифференцировать доброкачественные и злокачественные поражения с чувствительностью 94% и специфичностью 65%, оценить размер и локализацию любого патологического образования более 5 мм в диаметре [7, 9, 10]. Однако диагностика метастатических лимфоузлов такими томографами осуществляется менее уверенно, что связано в первую очередь с отсутствием в массовой практике катушек, которые бы обеспечивали одновременно возможность естественной визуализации молочных желез в положении лежа на животе и в то же время – визуализацию структур подмышечных впадин и грудной клетки [11]. Относительная дешевизна низкопольных МР-томографов, а также наличие помехоустойчивых катушек, позволяющих визуализировать структуры грудной клетки с высоким качеством, послужили толчком к исследованию с их помощью возможности одновременной визуализации первичного очага и оценке распространенности лимфогенного метастазирования. Было показано, что контрастированная низкопольная МРТ позволяет с большей чувствительностью и специфичностью дифференцировать доброкачественные и злокачественные поражения молочных желез (93% и 89%, соответственно), оценить размер и локализацию любого патологического образования более 7 мм в диаметре, а также достоверно выявить опухолевые поражения лимфатических узлов (в аксиллярной области, расположенных медиально, на уровне и латеральнее малой грудной мышцы) размером более 5 мм [11]. Однако на сегодняшний день существенными недостатками любой МРТ являются дороговизна и недостаток квалифицированных специалистов [3, 9].

Одним из новейших методов, является позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ). Принцип этого метода заключается в избирательном накоплении позитрон-излучающих изотопов (чаще всего ^{18}F -фтордезоксиглюкозы) в опухолевой ткани, с последующей регистрацией излучения и реконструкцией томографического изображения. В зависимости от стадии заболевания, чувствительность метода при первичном выявлении рака молочной железы составляет от 48% до 96%, специфичность – от 73% до 100% [12]. Как и при МРТ, чувствительность ПЭТ зависит от размеров патологического очага. Опухоли менее 10 мм в диаметре зачастую являются ложноотрицательными, так как их выявление ограничено пространственным разрешением современных ПЭТ-сканеров. Таким образом, кроме общих с МРТ, недостатками ПЭТ, являются низкая чувствительность прибора.

К сожалению, высокая чувствительность и недостаточная специфичность вышеописанных методов приводят к большому числу ложно положительных результатов, которые требуют выполнения инвазивной диагностической процедуры – забора образца ткани и его исследования методами микроскопического анализа. Достоверность цитологического исследования злокачественных новообразований молочной железы, полученных с помощью пункционной тонкоигольной аспирационной биопсии, под пальцевым контролем составляет 44%, под контролем УЗИ – 72% [13, 14]. Отрицательные результаты цитологического исследования, несмотря на точное попадание иглы в новообразование, могут быть связаны с примесью форменных элементов крови в анализируемом образце; недостаточным количеством забранного материала (что может быть связано с высокой плотностью узла либо высоким удельным весом соединительной ткани в структуре опухоли); забор материала из зон некроза. Достаточное количество биопсийного материала для исследования можно получить при использовании режущей иглы под УЗИ-контролем; как следствие, достоверность анализа возрастает до 86%. Наличие отрицательных результатов при заборе материала с помощью режущей иглы под УЗИ-контролем связано с неточным попаданием в патологический объект и с малым размером полученных образцов ткани из-за их фрагментации [13]. Таким образом, отрицательный результат тонкоигольной аспирационной биопсии и биопсии режущей иглой под УЗИ-контролем не говорит об отсутствии злокачественной опухоли и не может быть использован как показатель отрицательного прогноза в отношении рака молочной железы.

Таким образом, используемые в настоящее время методы инструментальной диагностики и связанные с ними диагностические процедуры не являются совершенными. Общим ограничением инструментальных методов является неоднозначность интерпретации результатов, связанная с многообразием индивидуальных особенностей строения и морфологией молочной железы. Кроме того, дороговизна наиболее чувствительных методов МРТ и ПЭТ не позволяет использовать их в скрининговых программах. В связи с вышеперечисленным, необходимы поиски новых методов диагностики, обладающих высокой специфичностью, чувствительностью, низкой стоимостью и позволяющие выявлять ранние стадии развития опухолевого процесса.

2. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ.

Лабораторная онкодиагностика объединяет методы детекции онкомаркеров – веществ, детектируемых в крови или моче при развитии патологического процесса. В настоящее время выделяют несколько типов онкомаркеров: метаболомные, протеомные, генетические, эпигенетические, иммуногистохимические и биохимические. Давно используемые иммуногистохимические и биохимические маркеры имеют диагностическое значение при уже сформировавшейся опухоли, которая секретирует в кровь достаточное для измерения количества антигенов. Таким образом, основной областью применения этих маркеров является мониторинг онкологического заболевания и оценка эффективности противоопухолевой терапии. Недостатком иммунохимических и биохимических маркеров является то, что они встречаются в небольших количествах в норме и при неонкологических заболеваниях, что приводит к ложноположительным результатам и тем самым уменьшает диагностическую ценность.

Развитие методов масс-спектрометрии и ядерного магнитного резонанса индуцировало поиск в кровотоке онкологических больных

метаболомных маркеров рака молочной железы. Метаболомные маркеры – это низкомолекулярные вещества (с мол. массой не более 1 кДа), характерные для трансформированных клеток, или концентрация которых повышается в таких клетках [15]. В литературе описано значительное количество метаболомных маркеров рака молочной железы, выявленных в культуральных клетках тканей (табл. 1) [16-23]. Позднее для диагностики рака молочной железы были предприняты попытки измерения концентрации в плазме крови таких потенциальных метаболомных маркеров как аминокислоты (например, глицина, аргинина), органические кислоты (пентадекановая кислота) и нуклеотиды (цитидин-5'-монофосфат, 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, 5-гидроксиметил-2'-дезоксинуридин) [24], холин-содержащие метаболиты (холин, фосфохолин и глицерофосфохолин) [25], а также использовать метаболомные маркеры для оценки рецидивов рака молочной железы [26] и наличия микрометастазов [15, 27]. В текущем году установлена панель маркеров, выявленных в сыворотке крови, позволяющая достоверно дискриминировать больных с локализованным и метастатическим раком молочной железы: гистидин, глутамат, фенилаланин, ацетоацетат, глицерол, пируват, N-ацетилгликопротеин и манноза [28]. Однако поскольку вышеперечисленные метаболомные маркеры не обладают высокой специфичностью (в силу того, что они обнаруживаются как в нормальных, так и в трансформированных клетках), требуется валидация их диагностической ценности с использованием больших групп как клинически здоровых доноров, пациентов группы риска развития онкологических заболеваний, так и больных с доброкачественными и злокачественными новообразованиями молочной железы.

Таблица 1. Перспективные метаболомные маркеры рака молочной железы, идентифицированные в культуре клеток/опухолевых биоптатах.

Маркер	Источник материала	Ссылка
Малат	Карцинома молочной железы MDA-MB-231	16
Пируват	Карцинома MDA-MB-231	16
2-оксoglутарат	Карцинома MDA-MB-231	16
Фруктозо-6-фосфат	Карцинома MDA-MB-231	16
Гистидин	Инвазивная карцинома протоков молочной железы MCF-7	17
Лактат	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей, инвазивная карцинома протоков молочной железы MCF-7	17, 18, 19
Глутамат	Карцинома MDA-MB-231, биоптаты опухолевой ткани	16, 20
β-аланин	биоптаты опухолевой ткани	20
2-гидроксиглутарат	биоптаты опухолевой ткани	20
Ксантин	биоптаты опухолевой ткани	20
Аминобутират-аминотрансфераза	биоптаты опухолевой ткани	20
Фосфохолин	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей	21, 22
Холин	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей	18, 21
Фосфохолин/глицерол-3-фосфат (отношение)	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей	18, 21
Аспартат	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей	18
Креатин	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей	18
Глицин	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей	18, 19
Таурин	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей	18, 22
СМФ/пентадекановая кислота (отношение)	Биоптаты здоровой и опухолевой тканей	23

В идеале опухолевые маркеры должны удовлетворять нескольким требованиям:

- присутствовать или синтезироваться только в опухолевых клетках;
- концентрация в крови должна коррелировать с размером опухоли;
- маркеры должны обнаруживаться до клинического проявления опухоли или её рецидивов.

Наиболее полно данным требованиям соответствуют протеомные, генетические (точечные мутации, микросателлитная нестабильность, амплификация некоторых геномных последовательностей) и эпигенетические маркеры, ассоциированные с онкотрансформацией клеток [29].

2.1. Белковые маркеры.

Генетические нарушения, имеющиеся в опухолевых клетках, приводят к изменению синтеза белков, в том числе синтезу мутантных форм, нарушениям экспрессии – повышению или снижению синтеза того или иного белка, появлению белков, характерных для эмбрионального периода развития. Качественная и количественная оценка этих белковых молекул обычно проводится иммунохимическими методами, где они выступают в качестве антигенов, однако чувствительность иммунохимических методов в тысячи раз меньше, чем у молекулярно – генетических методов (10^{-12} – 10^{-14} г). Количество биомаркеров, реально используемых и рекомендуемых международными организациями для диагностики и мониторинга рака молочной железы весьма ограничено.

Раковый эмбриональный антиген (РЭА) представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 175-200 кДа. В молекуле РЭА идентифицировано 6 различных антигенных детерминант. У взрослых людей РЭА продуцируется в очень ограниченном количестве эпителиальными клетками молочной железы, бронхов и кишечного тракта, а метаболизируется в печени. В норме сывороточный уровень РЭА не превышает 3 нг/мл. Повышенная концентрация этого антигена в крови наблюдается у 30-50% больных при карциномах молочной железы, головы и шеи, у 50-90% больных с карциномой пищеварительного тракта и дыхательных путей, а также у 23% больных злокачественных новообразований соединительнотканного происхождения. Очень высокие начальные концентрации РЭА до оперативного лечения могут указывать на метастазирование в регионарные лимфатические узлы [5].

Раковый антиген 15.3 (СА 15.3) представляет собой муциноподобный гликопротеин с молекулярной массой 300 кДа. Этот маркер используется для обнаружения и мониторинга течения рака молочной железы, контроля над эффективностью противоопухолевой терапии, выявления рецидива (часто в комбинации с РЭА). Границы нормы – не выше 28 Ед/мл у здоровых небеременных женщин. Повышенные концентрации СА 15.3 обнаруживаются при карциноме молочной железы (10% случаев при I стадии заболевания, 20% – при II стадии, 40% – при III стадии, 75% – при IV стадии) [30], в то время как при доброкачественных новообразованиях молочной железы его концентрация не увеличивается [31]. В результате тестирования 535 пациентов с опухолями различных локализаций было показано, что наибольший процент повышенной концентрации данного маркера (74%) выявлялся у больных с метастатическим раком молочной железы, в то время как при локализованном раке молочной железы – всего в 16%, при раке лёгкого – 17,8%, при неопухолевых поражениях печени – 16,7% [5].

Специфичность дифференциальной диагностики злокачественных опухолей с использованием обоих маркеров относительно доброкачественных

заболеваний молочной железы составляет 95%, однако это не приводит к повышению чувствительности, которая составляет 31% для первичной диагностики и 71% в случае диагностики метастазирующей карциномы молочной железы [29].

Несмотря на перечисленные недостатки РЭА и СА 15.3, за отсутствием лучшего метода клинической диагностики, эти маркеры широко используют на практике в сочетании с маммографией и ультразвуковым исследованием.

С развитием протеомных технологий открылись совершенно новые перспективы по выявлению более чувствительных и специфичных опухолевых белковых маркеров в крови. Анализ протеома плазмы/сыворотки крови при помощи двумерного электрофореза с последующей оцифровкой и идентификацией пятен осложнен присутствием в ней мажорных белков в очень высокой концентрации. Поскольку для сравнительных протеомных исследований наибольший интерес представляют именно минорные белки, для снижения концентрации альбумина и иммуноглобулина используют иммуноаффинную хроматографию [32] либо температурную обработку [33]. В последние несколько лет двумерный электрофорез был практически полностью вытеснен более производительными и точными масс-спектрометрическими методами [34]. В настоящее время идентифицировано более 400 перспективных протеомных маркеров рака молочной железы: гаптоглобин альфа-1, компонент комплемента С3а, трансферрин, аполипопротеин А-I и С-I, богатый гистидином гликопротеин и др. (табл. 2) [35-46].

Интересно отметить, что большинство идентифицированных белков не является продуктом опухолевых клеток, а относится к неспецифическим белкам воспаления. Вопрос о том, насколько могут быть применимы такие белки для онкодиагностики, является предметом острой дискуссии.

Увеличить специфичность протеомных маркеров рака молочной железы позволит, по-видимому, исследование белкового спектра циркулирующих в крови экзосом опухолевого происхождения. В наиболее строгой формулировке термин “экзосома” относится к мембранным частицам эндоцитозного происхождения размером 30-100 нм, которые образуются в результате слияния мультивезикулярных тел с плазматической мембраной. Состав белков экзосом во многом отражает их происхождение из эндосом и несколько различается в зависимости от типа клеток, из которых они происходят. По литературным данным, 1 мкл крови содержит около 3 миллионов экзосом, в каждую из которых входит около сотни белков, РНК (мРНК из приблизительно 1300 генов и около 100 различных миРНК) и липиды [47], при этом белки экзосом составляют менее 0,01% общего протеома плазмы [48]. Знания о белковом составе экзосом постоянно пополняются и депонируются в базе данных ExoCarta (www.exocarta.org); на сегодняшний день известно о существовании 4 653 экзосомальных белка. С помощью протеомного анализа культуральной среды клеток MDA-MB-231 (рак молочной железы) были идентифицированы 179 белков, из которых 32 белка выявлялись только в экзосомах. Авторы распределили эти белки на 8 функциональных групп: белки цитоскелета, регуляторы запрограммированной клеточной смерти, клеточного цикла, сигнальные белки, белки ответа на окислительный стресс, адгезии и клеточного движения. Среди идентифицированных экзосомальных белков были выявлены 14-3-3-ε и PDC6I – регуляторы пролиферации, клеточного цикла и запрограммированной смерти [49].

Таблица 2. Перспективные протеомные маркеры, идентифицированные в сыворотке крови больных раком молочной железы методами MALDI- и SELDI-TOF MS.

Маркер	Платформа (масса/заряд)		Функция белка	Ссылка
	MALDI	SELDI		
аполипопротеин А-I		28284	Метаболизм липидов	36
аполипопротеин А-II		9285		37
аполипопротеин А-IV	2508			38
аполипопротеин С-I		6647		36
Брадикинин (фрагменты)		904, 1061	Медиатор воспаления	38
С-концевой фрагмент компонента комплемента С3а		8100	Активация комплемента	39
		8116		40
		8129		40, 41
С3а des-R анафилатоксин		8900	Активация комплемента	39
		8926		40
		8919		41
		8941		42
		8936		36
С3f (фрагменты)	942-1865		Активация комплемента	38
С4а (фрагменты)	1627-2704		Активация комплемента	38
Фактор XIII	2602		Свертывание крови	38
Фибриноген альфа (фрагменты)	2379, 2659		Свертывание крови	38
		2661		43
Фибриноген А (фрагменты)	905-1537		Свертывание крови	38
Гаптоглобин (альфа 1)		9192	Связывание гемоглобина	36, 44, 45
ITIN4		4300	Функция не ясна	39, 40
		4286		41
		4276		42
	998-2358			38
Кининоген HMW		7790	Свертывание крови, выброс брадикинина	37
Трансферрин		81763	Белок острой фазы, связывание и транспорт железа, клеточная пролиферация	36
Транстиретин (фрагменты)	2451		Участник острой фазы, тиреоидный гормон- связывающий белок	38, 45
Гистидин-богатый гликопротеин	+		Функция не ясна	45
Лактоферрин	+		Противовирусная активность, активатор иммунного ответа	45
Кластерин (аполипопротеин J)			Регуляция апоптоза	45
Zn ²⁺ -альфа-2-гликопротеин	+		Функция не ясна	45
альфа1-антихимотрипсин	+		Ингибитор протеаз	45
альфа1-антитрипсин	+		Белок острой фазы, ингибитор протеаз	46

Примечание: + - данные по массе/заряду идентифицированных пептидов авторами не приведены.

Бурно развивающиеся протеомные исследования позволят увеличить набор таких маркеров и выявить их комбинации, наиболее ценные с диагностической точки зрения. Однако для широкого применения в клинике необходимы обширные рандомизированные/когортные исследования, которые действительно подтвердят диагностическую ценность новых протеомных экзосомальных маркеров.

2.2. Генетические онкомаркеры.

К генетическим маркерам относят все нарушения, которые изменяют структуру ДНК. Например, в опухолевой ДНК онкологических больных были обнаружены точечные мутации, микросателлитная нестабильность, амплификация некоторых геномных последовательностей.

В большинстве случаев мутации возникают в результате инсерции/делеции или замещения нуклеотидов. Самыми частыми дефектными генами при раке молочной железы являются *BRCA1* и *BRCA2* [5, 50, 51], в меньшей степени *p53*, *CHEK2*, *K-ras*, *PTEN*, *ATM* [52, 53].

Гены *BRCA1* и *BRCA2* наиболее исследованы и с их помощью возможна не только раннее обнаружение новообразования, но и выявление предрасположенности к развитию рака молочной железы [51]. Ген *BRCA1* расположен на длинном плече 17 хромосомы (17q21) и содержит 22 кодирующих и 2 некодирующих экзона. Этот ген кодирует белок молекулярной массой 190 кДа, состоящий из 1863 аминокислотных остатков (а.о.), который играет ключевую роль в поддержании целостности генома, участвует в регуляции транскрипции, подавляет пролиферацию клеток и участвует в процессах репарации ДНК [54, 55]. Описано более 1000 мутаций, расположенных как в стоп-кодоне, так и в рамке считывания данного гена [56]. Ген *BRCA2* расположен на 13 хромосоме (13q12) и состоит из 27 экзонов. Продуктом гена является белок с молекулярной массой 380 кДа (3418 а.о.), обладающий аналогичными функциями [57]. Несмотря на то, что мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* являются сильными предикторами развития рака молочной железы, они встречаются крайне редко: 1 мутация на 1000 женщин [58]. При наличии *BRCA1*-мутации вероятность развития рака молочной железы составляет 0,5-0,6 у женщин до 70 лет [59]. Показано, что инвазивный протоковый рак молочной железы ассоциирован с фенотипом *BRCA1*, в то время как для *BRCA2* такой закономерности не найдено [60]. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* у женщин с протоковой карциномой *in situ* выявляются в 10% и 17%, соответственно и не коррелируют с возрастом, расой и характеристикой опухоли [61].

Ген *p53*, расположенный на 17 хромосоме (17p13.1), поддерживает целостность генома путем запуска взаимосвязанных процессов контроля состояния ДНК [62]. Продукт этого гена является модулятором транскрипции, специфически взаимодействует с ДНК, трансктивируя гены, продукты которых являются ингибиторами циклин-зависимых киназ и участвующих в апоптозе клеток. При раке молочной железы частота мутаций гена *p53* варьирует от 25 до 86% в зависимости от стадии заболевания и метода детекции [63-66]. Кроме того, установлена достоверная корреляция наличия мутации в гене *p53* с неблагоприятным прогнозом течения заболевания [66, 67]. С другой стороны, во многих исследованиях отмечается, что этот маркер выявляется и при раке поджелудочной железы, кишечника, печени и других локализаций [68].

Продукт гена *CHEK2* (60 кДа), расположенного на 22 хромосоме (2q12.1), является киназой, вовлеченной в регуляцию контроля клеточного цикла, блокируя клетки в фазе G1 в ответ на повреждения ДНК, выступает

как супрессор злокачественной трансформации клеток. Показано, что при раке молочной железы мутации в гене *CHEK2* варьируют от 2% до 12% [69-72]. Кроме невысокого процента выявления этого маркера при раке молочной железы, необходимо отметить, что мутации в гене *CHEK2* выявляются также при колоректальном раке [73].

Одним из процессов, который может приводить к активации онкогенов и часто встречается в опухолевой ткани, является изменение числа копий различных локусов ДНК (амплификация/делеция генов). Амплификация участков ДНК может привести к активации онкогенов за счёт усиления их экспрессии и, как следствие, к нерегулируемому клеточному росту. Иногда толчком к злокачественному перерождению оказывается повышение уровня экспрессии протоонкогена, ярким примером этого при раке молочной железы может послужить амплификация гена *HER-2* [74]. Протоонкоген локализуется в 17 хромосоме и кодирует трансмембранный белок (185 кД) – рецептор человеческого эпидермального фактора роста. Он является уникальным представителем семейства трансмембранных тирозинкиназ: не имея собственного лиганда и не взаимодействуя ни с одним из известных факторов роста, активирующих родственные рецепторы, это ключевое звено передачи митотических сигналов всех ЭФР-подобных (Эпидермальные Факторы Роста) пептидов. Повышенная амплификация *HER-2* при раке молочной железы выявляется всего в 20% случаев [75-77], но определение статуса этого маркера входит в число обязательных исследований опухолевого материала. Показано, что амплификация *HER-2* коррелирует с агрессивным течением заболевания и коротким безрецидивным периодом [78].

Гены семейства *тус* (*c-тус*, *L-тус*, *N-тус*) являются ядерными онкогенами и играют важную роль в дифференцировке, росте и запрограммированной гибели клеток [79]. Гены *тус* участвуют в регуляции роста клеток, трансформации, ангиогенезе и регуляции клеточного цикла [80, 81]. В ряде исследований было показано, что повышение экспрессии генов семейства *тус* коррелирует с высокой пролиферативной активностью опухоли рака молочной железы и более короткой продолжительностью жизни пациентов. Поскольку, амплификация генов *c-тус* чаще наблюдается в опухолях на поздних стадиях, наличие этого маркера является неблагоприятным прогностическим показателем [80]. По данным мета-анализа, не менее чем трёхкратная амплификация гена *c-тус* наблюдается от 1% до 94% случаев, составляя в среднем 15,5% [81].

Микросателлитные маркеры представляют собой короткие многократно повторяющиеся и высоко полиморфные последовательности длиной от одного до шести или более нуклеотидов. Биологическая роль микросателлитов до конца не изучена, но известно, что человеческий геном содержит несколько тысяч микросателлитных последовательностей, большинство из которых находится в некодирующих районах ДНК [79]. Нарушения микросателлитной ДНК обычно проявляются как аллельная нестабильность (AI, Allelic imbalance) или как феномен потери гетерозиготности (LOH, Loss Of Heterozygosity). Потеря гетерозиготности может являться результатом исчезновения аллеля в результате его делеции. LOH может приводить к активации онкогенов и инактивации опухолевых генов-супрессоров, которые могут, в свою очередь, приводить к неконтролируемому росту клеток и метастазированию [82, 83]. По литературным данным, микросателлитные маркеры рака молочной железы (например, такие как D8S135, UGT1A1, D3S1611) выявляются в опухолевой ткани не чаще 17% случаев [84-85]. Позднее было установлено,

что встречаемость и частота выявления LON достоверно выше в *HER2*-положительных образцах (56,3, 26,7%), чем у в *HER2*-негативных (32,0, 12,2%) [86].

Теоретически, анализ LON в сочетании с одним или несколькими белковыми маркерами может быть полезным для создания диагностического теста, специфичного для рака молочной железы. Таким образом, микросателлитные маркёры, по-видимому, могут быть использованы для детекции злокачественных новообразований, однако поиск оптимальных мишеней остаётся актуальной задачей.

Суммируя результаты многочисленных исследований, стоит отметить, что генетические изменения, выявленные на сегодняшний момент, не являются специфичными, и данные, представленные в этой области, весьма разнообразны и противоречивы. Однако развитие современных методов анализа, таких как метод гибридизации ДНК на олигонуклеотидных чипах, полногеномное секвенирование, позволяющие расширить и интенсифицировать сравнительный анализ генетических изменений в норме и при патологии, вселяют большие надежды на то, что в обозримом будущем тканеспецифичные генетические ДНК-маркёры будут выявлены и найдут широкое применение для ранней диагностики злокачественных новообразований молочной железы.

2.3. Эпигенетические онкомаркеры.

Изменения профиля метилирования ДНК генов-супрессоров опухолевого роста являются одним из наиболее ранних и часто встречающихся эпигенетических событий, наблюдаемых при развитии опухолей различной локализации [87], включая рак молочной железы [88]. Такая модификация цитозинов в составе ДНК стимулирует неопластические процессы, блокируя транскрипцию генов опухолевой супрессии, и отвечают за начальные этапы индукции опухолевого роста [89].

Основная часть эпигенетических изменений ДНК связана с метилированием цитозинов в составе CpG-динуклеотидов промоторных областей генов опухолевой супрессии. Такая модификация блокирует транскрипцию гена и трансляцию белкового продукта, что приводит к возникновению и прогрессированию различных типов рака [89]. Большое значение для развития исследований в этой области имела разработка специфичной к метилированию ПЦР после бисульфитной конверсии ДНК, что позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять метилированные области ДНК [90].

Использование аберрантно метилированных форм генов в качестве онкомаркеров имеет ряд преимуществ по сравнению с вышеописанными генетическими изменениями ДНК. Во-первых, на сегодняшний день известно, что аберрантное метилирование ДНК является одним из наиболее распространённых и ранних событий, приводящих к опухолевой трансформации клетки [91, 92]. Во-вторых, чувствительность детекции аберрантно метилированного гена в условиях избытка неметилированного аллеля выше, чем для мутантного аллеля и составляет 1 метилированный аллель на 1000 неметилированных [79]. В-третьих, по сравнению с мутациями, которые могут возникнуть в любом месте гена, функционально-значимое метилирование локализовано только в CpG-богатых районах промоторных областей генов, что позволяет оптимизировать первичный скрининг маркерных участков, которые в дальнейшем будут детектированы при помощи метил-специфичной количественной ПЦР. Следует отметить,

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

что используя панель генов, можно многократно повысить чувствительность и специфичность выявления опухолей [79].

При исследовании опухолевой ДНК биоптатов было обнаружено, что при раке молочной железы вследствие гиперметилирования нарушена экспрессия более чем 40 генов. К таким генам относятся: регуляторы клеточного цикла (*CDKN2A*, *CDKN2B*, *p14/ARF*, *RB1*, циклины *D1* и *D2*), гены, ответственные за апоптоз (*TP53*, *CDKN1*, *HOX5*, *MDM2*, *DAPK1*, *TWIST1*, *YTMS1*, *FHIT*, *RASSF1A*, *HIC-1*, *HIN-1*), гены, ответственные за инвазию и метастазирование опухолевых клеток (*CDH1*, *CDH13*, *CTNB*), гены гормон- и рецептор-опосредованной передачи сигналов (*ESR1*, *PR*, *ER*, *RAR*, *NORE1*), а также гены систем репарации ДНК (*BRCA1*, *MGMT*) и детоксикации ксенобиотиков (*GSTP1*) [93-97]. Сведения о частоте выявления эпигенетических изменений в ДНК клеток опухоли представлены в таблице 3 [98-110].

Таблица 3. Частота выявления эпигенетических изменений в опухолевой ДНК при раке молочной железы.

Ген	Частота выявления, %		Прогноз/терапия	Ссылка
	норма	патология		
<i>APC</i>	-	90 (9/10)	Плохой/терапия не эффективна	98
	11 (3/27)	71 (15/21)		99
<i>RASSF1A</i>	7 (2/28)	68 (13/19)	Плохой/ оценка ответа на терапию тамоксифеном	100
	13 (2/15)	85 (17/20)		101
	-	87 (68/78)		102
<i>RARβ2</i>	-	80 (8/10)	Плохой / коррелирует с развитием метастаз	98
	25 (3/12)	53 (35/66)		103
<i>cyclinD2</i>	-	70 (7/10)	Плохой / не коррелирует с терапией	98
	0 (0/36)	28 (10/36)		103
<i>14-3-3-σ</i>	0 0/20	87 (33/38)	Крайне плохой/ коррелирует с развитием метастаз	104
	20 (3/15)	61 (61/100)		105
<i>E-cadherin</i>	-	47 (37/78)	Плохой/ коррелирует с инвазией и развитием метастаз	102
	0 (0/5)	50 (25/50)		106
<i>HIN1</i>	3 (1/30)	36 (18/50)	данных пока недостаточно	107
	-	19 (37/193)		108
	-	74 (28/38)		109
<i>GSTP1</i>	0 (0/30)	31 (11/35)	Плохой / коррелирует с развитием метастаз	107
	0 (0/15)	39 (14/36)		110

Позднее гиперметилирование промоторных областей различных генов было обнаружено в сыворотке/плазме больных раком молочной железы, а при сравнении уровня метилирования ДНК, полученной из клеток тканей опухоли и образцов крови того же пациента установлена достоверная корреляция [97].

На сегодняшний день отсутствуют эпигенетические маркеры, обладающие 100% чувствительностью и специфичностью к определённому типу рака. Для увеличения чувствительности и специфичности разрабатываемых диагностических тестов, многие авторы рассматривают панель генов, метилирование которых чаще всего приводит к развитию определённой неоплазии.

Ноге и соавторы при помощи количественной метил-специфичной ПЦР исследовали статус метилирования комбинации генов супрессоров опухолевого роста *APC*, *GSTP1*, *RASSF1A* и *RARβ2* в тканях больных раком молочной железы, а также в плазме здоровых женщин и онкологических больных [96]. Метилированные формы этих генов в образцах опухолевой ткани были обнаружены с частотой 23%, 44%, 42% и 14% для *RARβ2*, *RASSF1A*, *APC* и *GSTP1*, соответственно, причём в 57% образцах опухолевой ткани хотя бы у одного из генов промоторная область была метилирована. Кроме того, ни один из исследуемых эпигенетических маркеров не детектируется в образцах нетрансформированной ткани. Однако частота метилирования промоторной области вышеперечисленных опухолевых супрессорных генов в плазме крови больных раком молочной железы была ниже, чем в ткани (26% – для *RARβ2*, 32% – для *RASSF1A*, 17% – для *APC* и 26% – для *GSTP1*) [96]. Было показано, что в плазме крови 62% у больных раком молочной железы и 13% здоровых женщин обнаруживается метилированная форма, как минимум одного из генов.

Вае с соавторами при помощи метил-специфичной ПЦР показали, что гены *Cyclin D2*, *RARβ2*, *Twist* и *HIN-1* метилированы в тканях первичной опухоли молочной железы с частотой 53%, 56%, 41% и 77%, соответственно; в составе ДНК плазмы крови эти же гены были метилированы в образцах у 6%, 16%, 36% и 54% больных, соответственно [97]. Метилирование хотя бы одного из перечисленных генов в ДНК плазмы крови онкологических больных наблюдалось в 67% образцов. Авторами не было обнаружено корреляции между клинико-патологическими характеристиками опухоли; специфичность анализа при дискриминации здоровых женщин и больных раком молочной железы составила 87% [97].

При анализе трёх генов (*Cyclin D2*, *RARβ2* и *Twist*), гиперметилирование в образцах жидкости из протоков молочной железы было выявлено у 85% пациентов со злокачественными опухолями молочной железы и у 29% пациентов с внутрипротоковой карциномой *in situ*. Гиперметилирование тех же генов в образцах внутрипротоковой жидкости было обнаружено у 11% женщин с нормальной маммограммой, причём у 40% женщин этой группы впоследствии был диагностирован рак молочной железы [111].

Dulaimi и соавторы при помощи метил-специфичной ПЦР показали, что гены опухолевой супрессии *APC*, *RASSF1A* и *DAP-kinase* метилированы в опухолевой ткани больных раком молочной железы в 44%, 65% и 50% соответственно, в то время как в плазме больных промоторные области данных генов метилированы в 29%, 56% и 35% случаев, соответственно. Метилированные формы генов *APC*, *RASSF1A* и *DAP-kinase* авторы не детектировали как в здоровой ткани, так и в плазме крови здоровых доноров.

В целом, в 94% случаев (32 из 34) в опухолях было обнаружено метилирование как минимум одного или трёх рассматриваемых генов, однако не все метилированные гены были найдены в ДНК плазме крови [112].

Онкоспецифические последовательности нуклеиновых кислот могут быть обнаружены в пуле циркулирующих ДНК более эффективно, если в качестве их источника наряду с циркулирующими ДНК плазмы крови использовать нуклеиновые кислоты, связанные с поверхностью форменных элементов [113]. В частности, было показано, что частота метилирования промоторных областей генов *RASSF1A* и *RARβ2* у больных раком молочной железы на I-III стадиях была выше во внеклеточной ДНК, связанной с поверхностью форменных элементов крови (95%), чем в циркулирующей ДНК плазмы (30%). При использовании для анализа суммарной циркулирующей ДНК крови (циркулирующей ДНК плазмы крови и ДНК, связанной с поверхностью клеток крови) метилирование хотя бы одного из генов было обнаружено у 95% больных. Таким образом, анализ профиля метилирования циркулирующей ДНК, связанной с поверхностью клеток крови вместе с циркулирующей ДНК из плазмы, может значительно увеличить точность ранней диагностики онкологических заболеваний [114].

В последние годы наблюдается значительный прогресс в исследовании новой группы потенциальных эпигенетических онкомаркеров – микроРНК (миРНК, *miRNA*), представляющих собой некодирующие РНК длиной от 21 до 25 нуклеотидов. Предшественниками микроРНК являются эндогенные короткие шпилечные структуры, а их мишенями – другие локусы со сходной, но не идентичной нуклеотидной последовательностью, где микроРНК вызывает репрессию трансляции [115]. Большинство микроРНК консервативны и располагаются в районах, наиболее часто вовлечённых в структурные перестройки хромосом или в ломких сайтах, что, как уже установлено, имеет значение в развитии онкологических заболеваний [79]. В норме микроРНК участвуют во многих клеточных процессах, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, иммунную регуляцию. Экспрессию некоторых микроРНК связывают с инициацией и прогрессией многих типов рака [116]. Показано, что такие онкогенные микроРНК (*oncomiR*) могут выполнять роль как онкогенов, так и генов-супрессоров опухолевого роста, активно регулируя процессы роста и деления клеток, опухолевой инвазии и метастазирования [117, 118]. Поскольку уже на самых ранних стадиях развития канцерогенеза опухоли имеют уникальный профиль экспрессии микроРНК, поиск таких тканеспецифических маркеров является крайне перспективным [117]. Сравнительный анализ профиля экспрессии микроРНК в нормальной и злокачественной ткани молочной железы показал серьезные различия – экспрессия *miR-195*, *miR-21*, *miR-155*, *miR-17~92* была значительно повышена и коррелировала с такими характеристиками опухоли как стадия, пролиферативный индекс, экспрессия эстрогеновых и прогестероновых рецепторов, HER-2 статус, активный ангиогенез [116, 119, 120]. Позднее диагностическая значимость была подтверждена для микроРНК в плазме/сыворотке крови онкологических больных [121, 122]. В частности, на большой группе женщин (170 больных раком молочной железы и 100 здоровых доноров) было обнаружено достоверное повышение концентрации *miR-16*, *miR-21*, *miR-451* в плазме крови больных раком молочной железы [122]. Поскольку основная часть микроРНК крови содержится в экзосомах или комплексах с липопротеинами высокой плотности [123, 124], для уверенной детекции тканеспецифичных

микроРНК необходимо использовать предварительную пробоподготовку образцов крови путём выделения и концентрирования микровезикул или липопротеиновых комплексов, что в свою очередь повысит чувствительность и специфичность ПЦР-систем.

На сегодняшний день идентифицировано более 2000 микроРНК. Какое количество этих микроРНК участвует в механизмах канцерогенеза, предстоит еще выяснить. Однако становится ясно, что профиль экспрессии тканеспецифичных микроРНК может быть использован для разработки ранней диагностики злокачественных заболеваний, в том числе и рака молочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Несмотря на эффективность инструментальных методов диагностики рака молочной железы, существует ряд ограничений для выявления этими методами заболевания на I стадии и рака *in situ*, дискриминацию доброкачественных и злокачественных новообразований, скрининговые исследования здоровых и больных после курсов терапии. Анализ большинства вышеописанных генетических и эпигенетических нарушений опухолевой ДНК в ткани также не позволяет с достаточной чувствительностью и специфичностью выявлять непластический процесс. Наиболее перспективными для ранней диагностики рака молочной железы является анализ метилирования промоторных областей генов опухолевой супрессии в составе циркулирующих в крови ДНК и микроРНК. Вполне вероятно, что в ближайшее время выявление эпигенетических маркеров в крови пациентов в комбинации с инструментальными методами диагностики позволит выявлять рак молочной железы на бессимптомной и на I стадии заболевания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 12-04-31365 мол_а), Министерства образования и науки РФ (Соглашение № 8289), а также поддержана стипендией Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-1133.2012.4).

ЛИТЕРАТУРА

1. Jermal A., Bray F., Center M., Ferlay J., Ward E., Forman D. (2011) SA Cancer J. Clin., **61**, 69-90.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. (2009) Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, **20**(3), (прил. 1), 8- 158.
3. Чиссов В.И., Дарьялова С.Л. (2000) Избранные лекции по клинической онкологии, Фонд паллиативной медицины, М.
4. Комарова Л.Е. (2008) Опухоли женской репродуктивной системы, **3**, 20-23.
5. Кушлинский Н.Е., Портный С.М., Лактионов К.П. (2005) Рак молочной железы. РАМН, М.
6. Комарова Л.Е. (2008) Сибирский онкологический журнал, Прил. 2, 9-13.
7. Popiel M., Mroz-Klimas D., Kasprzak R., Furmanek M. (2012) Pol. J. Radiol., **77**(4), 35-44.
8. Бухарин Д.Г., Величко С.А., Фролова И.Г., Лунева С.В. (2012) Сибирский онкологический журнал, **27**(1), 99-102.
9. Серебрякова С.В., Труфанов Г.Е., Юхно Е.А. (2009) Опухоли женской репродуктивной системы, **3-4**, 20-25.
10. Popiel T.J., Kibil W., Herman-Sucharska I., Urbanik A. (2013) Videosurgery Miniinv, **8**(1), 55-62.

11. Усов В.Ю., Белянин М.Л., Красулина Н.А., Староха В.В., Коломиец С.А. (2009) Радиология-практика, **6**, 19-29.
12. Warning K., Hildebrandt M.G., Kristensen B., Ewertz M. (2011) Dan. Med. Bull., **58**(7), A4289.
13. Козлов А.О., Сапожников В.Г., Халеев Д.В., Халеева Н.Н. (2007) Вестник новых медицинских технологий, **14**(4), 95-98.
14. Игнатова Н.В., Важеннин А.В., Шкута М.В. (2009) Уральский мед. журнал, **4**(58), 57-60.
15. Oakman C., Tenori L., Biganzoli L., Santarpia L., Cappadona S., Luchinat C., Leo A.D. (2011) Int. J. Biochem. Cell Biol., **43**, 1010-1020.
16. Kotze H.L., Armitage E.G., Sharkey K.J., Allwood J.W., Dunn W.B., Williams K.J., Goodacre R. (2013) BMC Syst. Biol., **7**(1), 107.
17. Martineau E., Tea I., Akoka S., Giraudeau P. (2012) NMR Biomed., **25**, 985-992.
18. Bathen T.F., Geurts B., Sitter B., Fjosne H.E., Lundgren S., Buydens L.M., Gribbestad I.S., Postma G., Giskeudega G.F. (2013) PLoS One, **8**(4), e1578.
19. Giskeodegard G.F., Lundgren S., Sitter B., Fjosne H.E., Postma G., Buydens L.M.C., Gribbestad I.S., Bathen T.F. (2012) NMR Biomed., **25**(11), 1271-1279.
20. Budczies J., Brockmoller S.F., Muller B.M., Barupal D.K., Richter-Ehrenstein C., Kleine-Tebbe A., Griffin J.L., Oresic M., Dietel M., Denkert C., Fiehn O. (2013) J. Proteomics, **94**, 279-288.
21. Mimmi M.C., Finato N., Pizzolato G., Beltrami C.A., Fogolari F., Corazza A., Esposito G. (2013) Anal. Cell. Pathol., **36**, 71-83.
22. Li M., Song Y., Cho N., Chang J.M., Koo H.R., Yi A., Kim H., Park S., Moon W.K. (2011) PLoS One, **6**(10), e25563.
23. Budczies J., Denkert C., Müller B.M., Brockmoller S.F., Klauschen F., Gyorffy B., Dietel M., Richter-Ehrenstein C., Marten U., Salek R.M., Griffin J.L., Hilvo M., Ore M., Wohlgemuth G., Fiehn O. (2012) BMC Genomics, **13**, e334.
24. Zhang A., Sun H., Qiu S., Wang X. (2013) Clin. Chim. Acta, **242**, 3-7.
25. Denkert C., Bucher E., Hilvo M., Salek R., Oresic M., Griffin J., Brockmoller S., Klauschen F., Liobl S., Barupal D.K., Budczies J., Iljin K., Nekljudova V., Fiehn O. (2012) Genome Med., **4**(4), 37.
26. Asiago V.M., Alvarado L.Z., Shanaiah, Gowda G.A., Owusu-Safro K., Ballas R.A., Raftery D. (2010) Cancer Res., **70**, 8309-8318
27. Tenori L., Oakman C., Claudino W.M., Bernini P., Cappadona S., Nepi S., Biganzoli L., Arbushites M.C., Luchinat C., Bertini I., Di L.A. (2012) Mol. Oncol., **6**, 437-444.
28. Jobard E., Pontoizeau C., Blaise B.J., Bachelot T., Elena-Herrmann B., Tredan O. (2013) Cancer Lett., 2013 doi: 10.1016/j.canlet.2013.09.011.
29. Белохвостов А.С., Румянцев А.Г. (2003) Онкомаркеры, молекулярно-генетические, иммунохимические, биохимические анализы. МАКС Пресс, М.
30. Duffy M.J. (2006) Clin. Chem., **52**(3), 345-351.
31. Mathelin C., Cromer A., Wendling C., Tomasetto C., Rio M.C. (2006) Breast Cancer Res. Treat., **96**, 83-93.
32. Walker J.M. (Ed.) (2009) The protein protocols handbook, third Edition, Humana Press, Softcover.
33. Гоуфман Е.И., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Лохов П.Г., Згода В.Г., Серебрякова М.В., Торопыгин И.Ю., Власова М.А., Сафарова М.Р., Макаров О.В., Арчаков А.И. (2006) Биохимия, **71**, 445-453.

34. *Schone C., Hofler H., Walch A.* (2013) Clin. Biochem., **46**, 539-545.
35. *Gast M.-C.W., Schellens J.H.M., Beijnen J.H.* (2009) Breast Cancer Res. Treat., **116**, 17-29.
36. *Goncalves A., Esterni B., Bertucci F., Sauvan R., Chabannon C., Cubizolles M., Bardou V.J., Houvenaegel G., Jacquemier J., Granjeaud S., Meng X.Y., Fung E.T., Birnbaum D., Maraninchi D., Viens P., Borg J.P.* (2006) Oncogene, **25**, 981-989.
37. *Heike Y., Hosokawa M., Osumi S., Fujii D., Aogi K., Takigawa N., Ida M., Tajiri H., Eguchi K., Shiwa M., Wakatabe R., Arikuni H., Takaue Y., Takashima S.* (2005) Anticancer Res., **25**, 1197-1203.
38. *Villanueva J., Shaffer D.R., Philip J., Chaparro C.A., Erdjument-Bromage H., Olshen A.B., Fleisher M., Lilja H., Brogi E., Boyd J., Sanchez-Carbayo M., Holland E.C., Cordon-Cardo C., Scher H.I., Tempst P.* (2006) J. Clin. Invest., **116**, 271-284.
39. *Li J., Zhang Z., Rosenzweig J., Wang Y.Y., Chan D.W.* (2002) Clin. Chem., **48**(8), 1296-1304.
40. *Li J., Orlandi R., White C.N., Rosenzweig J., Zhao J., Seregini E., Morelli D., Meng X.Y., Zhang Z., Davidson N.E., Fung E.T., Chan D.W.* (2005) Clin. Chem., **51**, 2229-2235.
41. *Mathelin C., Cromer A., Wendling C., Tomasetto C., Rio M.C.* (2006) Breast Cancer Res. Treat., **96**, 83-90.
42. *van Winden A.W., Gast M.C., Beijnen J.H., Rutgers E.J., Grobbee D.E., Peeters P.H., van Gils C.H.* (2009) BMC Med. Genomics, **2**, 4.
43. *Shi Q., Harris L.N., Lu X., Li X., Hwang J., Gentleman R., Iglehart J.D., Miron A.* (2006) J. Proteome Res., **5**, 2947-2955.
44. *Gast M.C., van Tinteren H., Bontenbal M., van Hoesel R.Q., Nooij M.A., Rodenhuis S., Span P.N., Tjan-Heijnen V.C., de Vries E.G., Harris N., Twisk J.W., Schellens J.H., Beijnen J.H.* (2008) BMC Cancer, **8**, 389.
45. *Drake R.R., Cazares L.H., Jones E.E., Fuller T.W., Semmes O.J., Laronga C.* (2011) OMICS J. Integr. Biol., **15**, 251-259.
46. *Abbott K.L., Aoki K., Lim J.M., Porterfield M., Johnson R., O'Regan R.M., Wells L., Tiemeyer M., Pierce M.* (2008) J. Proteome Res., **7**, 1470-1480.
47. *Vlassov A.V., Magdaleno S., Setterquist R., Conrad R.* (2012) Biochem. Biophys. Acta, **1820**, 940-948.
48. *Pant S., Hilton H., Burczynski M.E.* (2012) Biochem. Pharmacol., **83**, 1484-1494.
49. *Palazzolo G., Albanese N.N., Cara G.D., Gyax D., Vittorelli M.L., Pucci-Minafra I.* (2012) Anticancer Res., **32**, 847-860.
50. *Olopade O.I., Grushko T.A., Nanda R., Huo D.* (2008) Clin. Cancer Res., **14**, 7988-7999.
51. *Thompson M.E.* (2010) FEBS J., **277**, 3072-3078.
52. *Garcia J.M., Garcia V., Silva J., Pen C., Dominguez G., Sanchez A., Sanfrutos L., Provencio M., Millan I., Chaparro D., Espan P., Bonilla F.* (2006) Genes Chromosomes Cancer, **45**, 692-701.
53. *Jung K., Fleischhacker M., Rabien A.* (2010) Clin. Chem. Acta, **411**, 1611-1624.
54. *Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal P., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C.* (1994) Science, **266**, 66-71.
55. *Venkitaraman A.R.* (1999) Science, **5442**(286), 1100-1102.
56. *Steffensen A.Y., Jønson L., Ejlersen B., Gerdes A.M., Nielsen F.C., Hansen T.V.* (2010) Fam. Cancer, **9**(3), 283-287.

57. Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., Gumbs C., Micklem G. (1995) *Nature*, **378**, 789-792.
58. Ford D., Easton D.F., Bishop D.T. (1994) *Lancet*, **343**, 692-695.
59. Maric P., Ozretih P., Levanat S., Oresković S., Antunac K., Beketih-Oreskovich L. (2011) *Coll. Antropol.*, **35**, 241-247.
60. Foulkes W. (2006) *Fam. Cancer*, **5**, 135-142.
61. Bayraktar S., Elsayegh N., Gutierrez-Barrera A.M., Lin H., Kuerer H., Tasbas T., Muse K.I., Ready K., Litton J., Meric-Bernstam F., Hortobagyi G.N., Albarracin C.T., Arun B. (2012) *Cancer*, **118**, 1515-1522.
62. Zhu Q., Wani M.A., El-Mahdy M., Wani G., Wani A.A. (2000) *Mol. Carcinog.*, **28**, 215-224.
63. Silva J.M., Silva J., Sanchez A., Garcia J.M., Dominguez G., Provencio M., Sanfrutos L., Jareco E., Colas A., Espaca P., Bonilla F. (2002) *Clin. Cancer Res.*, **8**, 3761-3766.
64. Olivier M., Hainaut P. (2001) *Semin. Cancer Biol.*, **11**, 353-360.
65. Dimitrakakis C., Konstadoulakis M., Messaris E., Karayannis M., Panoussopoulos D., Michalas S., Androulakis G. (2002) *Breast*, **11**, 279-285.
66. Денисов У.В., Литвяков Н.В., Стахеева М.Н., Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Малиновская Е.А., Бабышкина Н.Н., Стегний В.Н., Чердынцева Н.В. (2008) *Сибирский онкологический журнал*, **2**(26), 32-36.
67. Feki A., Irminger-Finger I. (2004) *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **52**, 103-116.
68. Fleischhacker M., Schmidt B. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1775**, 181-232.
69. Vahteristo P., Bartkova J., Eerola H., Syrjakoski K., Ojala S., Kilpivaara O., Tamminen A., Kononen J., Aittomaki K., Heikkila P., Blomqvist C., Bartek J., Kallioniemi O.P., Nevanlinna H. (2002) *Am. J. Hum. Genet.*, **71**, 432-438.
70. de Bock G.H., Schutte M., Krol-Warmerdam E.M., Seynaeve C., Blom J., Brekelmans C.T., Meijers-Heijboer H., van Asperen C.J., Cornelisse C.J., Devilee P., Tollenaar R.A., Klijn J.G. (2004) *J. Med. Genet.*, **41**, 731-735.
71. Huzarski T., Cybulski C., Domagala W., Gronwald J., Byrski T., Swiec M., Woyke S., Narod S.A., Lubinski J. (2005) *Breast Cancer Res. Treat.*, **90**, 187-189.
72. Kuusisto K., Bebel A., Vihinen M., Schleutker J., Sallinen S.L. (2011) *Breast Cancer Res.*, **13**, 20.
73. Liu C., Wang Q.S., Wang Y.J. (2012) *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **13**, 2051-2055.
74. Udove J., Ullrich A. (1989) *Science*, **244**, 707-712.
75. Owens M.A., Horten B.C., Da Silva M.M. (2004) *Clin. Breast Cancer*, **5**, 63-69.
76. Murad N.A.A., Razak Z.A., Hussain R.M., Hussain S.N.A.S., Huat C.K.C., Ali S.A.C.M., Abdullah N., Muhammad R., Ibrahim N., Jamal R. (2013) *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, **14**, 1655-1659.
77. Weigel M.T., Dowsett M. (2010) *Endocr. Relat. Cancer*, **17**, 245-262.
78. Bilous M., Morey A., Armes J.E., Bell R., Button P.H., Cummings M.C., Fox S.B., Francis G.D., Waite B., McCue G., Raymond W.A., Robbins P.D., Farshid G. (2012) *Breast Cancer Res. Treat.*, **134**, 617-624.
79. Пальцев М.А., Залетов Д.В. (2009) Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. Медицина, М.
80. Chen Y., Olopade O.I. (2008) *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **8**, 1689-1698.
81. Liao D.J., Dickson R.B. (2000) *Endocr. Relat. Cancer*, **7**, 143-164.
82. Chen Y., Chen C. (2008) *Head Neck*, **30**, 1361-1383.

83. *Silva J.M., Garcia J.M., Dominguez G., Silva J., Miralles C., Cantos B., Coca S., Provencio M., Espana P., Bonilla F.* (2002) *Ann. Surg. Oncol.*, **9**, 71–76.
84. *de Vargas Wolfgramm E., Alves L.N.R., Stur E., Tovar T.T., De Nadai Sartori M.P., De Castro Neto A.K., Louro I.D.* (2013) *Mol. Biol. Rep.*, **40**, 2139–2144.
85. *Janatova M., Pohlreich P.* (2004) *Prague Med. Rep.*, **105**, 111–118.
86. *Tokunaga E., Okada S., Yamashita N., Akiyoshi S., Kitao H., Morita M., Kakeji Y., Maehara Y.* (2012) *Breast Cancer*, **19**, 161–169.
87. *Attwood J.T., Yung R.L., Richardson B.C.* (2002) *Cell Mol. Life Sci.*, **59**, 241–257.
88. *Parrella P.* (2010) *Breast Care (Basel)*, **5**, 66–73.
89. *Esteller M.* (2008) *N. Engl. J. Med.*, **358**, 1148–1159.
90. *Лухтеништейн А.В., Киселева Н.П.* (2001) *Биохимия*, **66**, 293–317.
91. *Carmona F.J., Esteller M.* (2011) *Cancer Biomark.*, **9**, 101–111.
92. *Jones P.A., Baylin S.B.* (2002) *Nat. Rev. Genet.*, **6**, 415–428.
93. *Widschwendter M., Jones P.A.* (2002) *Oncogene*, **35**, 5462–5482.
94. *Agrawal, A. Murphy R.F., Agrawal D.K.* (2007) *Mod. Pathol.*, **20**, 711–721.
95. *Esteller M., Corn P.G., Baylin S.B., Herman J.G.* (2001) *Cancer Res.*, **61**, 3225–3229.
96. *Hoque M.O., Feng Q., Toure P., Dem A., Critchlow C.W., Hawes S.E., Wood T., Jeronimo C., Rosenbaum E., Stern J., Yu M., Trink B., Kiviat N.B., Sidransky D.* (2006) *J. Clin. Oncol.*, **24**, 4262–4269.
97. *Bae Y.K., Shim Y.R., Choi J.H., Kim M.J., Gabrielson E., Lee S.J., Hwang T.Y., Shin S.O.* (2005) *Cancer Res. Treat.*, **37**, 233–240.
98. *Wu J.M., Fackler M.J., Halushka M.K., Molavi D.W., Taylor E., Teo W.W., Griffin C., Fetting J., Davidson N.E., DeMarzo A.M., Hicks J.L., Chitale D., Ladanyi M., Sukumar S., Argani P.* (2008) *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1938–1946.
99. *Van der Auwera I., Van den Bosch S.M., Van Laere S.J., Van den Eynden G.G., Trinh B.X., van Dam P.A., Colpaert C.G., van Engeland M., Van Marck E.A., Vermeulen P.B., Dirix L.Y.* (2008) *Brit. J. Cancer*, **99**, 1735–1742.
100. *Fackler M.J., Veigh M.M., Mehrotra J., Blum M.A., Lange J., Lapides A., Garrett E., Argani P., Sukumar S.* (2004) *Cancer Res.*, **64**, 4442–4452.
101. *Shukla S., Mirza S., Sharma G., Parshad R., Gupta S.D., Ralhan R.* (2006) *Epigenetics*, **1**(2), 88–93.
102. *Karray-Chouayekh S., Trifa F., Khabir A., Boujelbane N., Sellami-Boudawara T., Daoud J., Frikha M., Jlidi R., Gargouri A., Mokdad-Gargouri R.* (2010) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **136**, 203–210.
103. *Jeronimo C., Monteiro P., Henrique R., Dinis-Ribeiro M., Costa I., Costa V.L., Filipe L., Carvalho A.L., Hoque M.O., Pais I., Leal C., Teixeira M.R., Sidransky D.* (2008) *Breast Cancer Res. Treat.*, **109**, 27–34.
104. *Jing F., Zhang J., Tao J., Zhou Y., Jun L., Tang X., Wang Y., Hai H.* (2007) *Onkologie*, **30**, 14–19.
105. *Mirza S., Sharma G., Parshad R., Srivastava A., Gupta S.D., Ralhan R.* (2010) *Clin. Biochem.*, **43**, 380–386.
106. *Prasad C.P., Mirza S., Sharma G., Prashad R., Gupta S.D., Rath G., Ralhan R.* (2008) *Life Sci.*, **83**, 318–325.
107. *Park S.Y., Kwon H.J., Lee H.E., Ryu H.S., Kim S.W., Kim J.H., Kim I.A., Jung N., Cho N.-Y., Kang G.H.* (2011) *Virchows Arch.*, **458**, 73–84.
108. *Xu J., Shetty P.B., Feng W., Chenault C., Bast R.C., Issa J.P., Hilsenbeck S.G., Yu Y.* (2012) *BMC Cancer*, **12**, 243.
109. *Feng W., Orlandi R., Zhao N., Carcangiu M.L., Tagliabue E., Xu J., Bast R.C. Jr., Yu Y.* (2010) *BMC Cancer*, **10**, 378.

110. Lee J.S. (2007) *Virchows Arch.*, **450**, 637–642.
111. Evron E., Dooley W.C., Umbricht C.B. (2001) *Lancet*, **357**, 1335–1336.
112. Dulaimi E., Hillinck J., Ibanez de Caceres I., Al-Saleem T., Cairns P. (2004) *Clin. Cancer Res.*, **10**, 6189–6193.
113. Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. (2008) *Мол. биол.*, **42**, 12–23.
114. Рыкова Е.Ю., Скворцова Т.Э., Хоффман А.Л., Тамкович С.Н., Стариков А.В., Брызгунова О.Е., Пермякова В.И., Варнеке Е., Шакиель Г., Власов В.В., Лактионов П.П. (2008) *Биомед. химия*, **54**, 94–103.
115. Ekstrom K. (2008) *Exosomal Shuttle RNA*. Intellecta Docuys AB, Guteborg.
116. Garzon R., Calin G.A., Croce C.M. (2009) *Annu. Rev. Med.*, **60**, 167–179.
117. Hu G., Drescher K.M., Chen X.-M. (2012) *Front. Genet.*, **3**, 56.
118. He L., Thomson M.J., Hemann M.T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S.W., Hannon G.J., Hammond S.M. (2005) *Nature*, **435**, 828–833.
119. Concoran C., Friel A.M., Duffy M.J., Crown J., O'Driscoll L. (2011) *Clin. Chem.*, **57**(1), 18–32.
120. Wittmann J., Jack H.-M. (2010) *Biochem. Biophys. Acta*, **1806**, 200–207.
121. Guttery D.S., Blighe K., Page K., Marchese S.D., Hills A., Coombes R.C., Stebbing J., Shaw J. (2013) *Cancer Metastasis Rev.*, **32**, 289–302.
122. Ng E.K.O., Li R., Shin V.Y., Jin H.C., Leung C.P.H., Ma E.S.K., Pang R., Chua D., Chu K.-M., Law S.Y.K., Poon R.T.P., Kwong A. (2013) *PLoS One*, **8**(1), e53141.
123. Gallo A., Tandon M., Alevizos I., Illei G.G. (2012) *PLoS One*, **7**(3), e30679.
124. Turchinovich A., Weiz L., Langheinz A., Burwinkel B. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**(16), 7223–7233.

Поступила: 08. 07. 2013.

MODERN APPROACH OF BREAST CANCER DIAGNOSTICS

S.N. Tamkovich^{1,2}, V.E. Voytsitskiy³, P.P. Laktionov¹

¹Institute of chemical biology and fundamental medicine SB of RAS, pr. Lavrentieva, 8, Novosibirsk, 630090 Russia; tel.: +7(383)363-51-44; fax: 7(383)363-51-53; e-mail: s.tamk@niboch.nsc.ru

²Novosibirsk national research state university, ul. Pirogova, 2, Novosibirsk, 630090 Russia; tel.: +7(383)363-51-44; fax: 7(383)363-41-92

³Novosibirsk regional oncological dispensary, ul. Plachotnogo, 2, Novosibirsk, 630108 Russia; tel./fax: +7(383)301-31-51

In the review have been classified literature data concerning modern instrumental, microscopic and molecular (metabolomics, proteomics, genetics and epigenetics) approaches for early breast cancer diagnostics. The analytical performance and perspectives of their application in clinical practice also have been evaluated.

Key words: breast cancer, tumor markers, circulating nucleic acids, early cancer diagnostics.