

УДК 575.113.1

ДИЗАЙН ПАНЕЛЕЙ ПРЕДИКТИВНЫХ МАРКЕРОВ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕОАДЬЮВАНТНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ШИРОКОГЕНОМНОГО СКРИНИНГА МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК

© 2022 г. А. И. Калинин¹, В. О. Сигин¹, Е. О. Игнатова², М. А. Фролова², Е. Б. Кузнецова^{1,3}, И. Ю. Виноградов⁴, М. И. Виноградов⁵, И. И. Виноградов^{4,5}, М. В. Немцова^{1,3}, Д. В. Залетаев¹, А. С. Танас¹, В. В. Стрельников¹. *

¹Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова, Москва, 115522 Россия

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

⁴Областной клинический онкологический диспансер, Рязань, 390046 Россия

⁵Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Рязань, 390026 Россия

*e-mail: vstrel@list.ru

Поступила в редакцию 01.12.2021 г.

После доработки 10.02.2022 г.

Принята к публикации 22.02.2022 г.

Частота полного патоморфологического ответа на неоадьювантную химиотерапию (НАХТ) при трижды негативном раке молочной железы невысока и колеблется от 30 до 40%. При этом на сегодняшний день практически отсутствуют предиктивные маркеры эффективности НАХТ для этого подтипа опухолей. В настоящей статье предлагается подход к идентификации прогностических эпигенетических маркеров чувствительности трижды негативных опухолей молочной железы к НАХТ, диагностика которых возможна с использованием метилчувствительной ПЦР. Отбор маркеров проводили из массива данных широкогеномного бисульфитного секвенирования ДНК XmaI-RRBS, проведенного для опухолевых биопсий, полученных от 34 пациенток до начала НАХТ, и для 6 образцов нормальных тканей молочной железы. Пациентки были разделены на группы ответивших (полный патоморфологический ответ) или не ответивших (наличие остаточной опухоли) на химиотерапию. Были определены CpG-динуклеотиды, дифференциальное метилирование которых позволяет различать образцы трижды негативных опухолей с различной чувствительностью к НАХТ, и разработана панель маркеров метилирования, включающая участки CpG-островков генов *RUSC1/RUSC1-AS1*, *MXRA5* и *ANKRD46*, дизайн которой соответствует требованиям, предъявляемым к тест-системам на основе метилчувствительной ПЦР. Расчетная диагностическая точность панели из этих трех маркеров метилирования составляет 0.79 (сvAUC = 0.80, 95%ДИ: 0.79–0.82).

Ключевые слова: трижды негативный рак молочной железы, метилирование ДНК, широкогеномное бисульфитное секвенирование, XmaI-RRBS, неоадьювантная химиотерапия, метилчувствительная ПЦР.

DOI: 10.31857/S0016675822070086

Трижды негативный подтип рака молочной железы (ТНРМЖ) составляет от 15 до 20% всех случаев рака молочной железы (РМЖ) и является агрессивным заболеванием с высоким уровнем метастазирования, частым возникновением рецидивов и низкой выживаемостью по сравнению с другими подтипами РМЖ [1]. Важным этапом лечения ТНРМЖ является неоадьювантная химиотерапия (НАХТ) [2]. В настоящее время наиболее распространены схемы НАХТ ТНРМЖ на основе антрациклинов и таксанов [3]. Полный патоморфологический ответ (pCR – pathologic complete re-

sponse) после НАХТ ассоциирован с лучшим прогнозом, тогда как остаточная опухоль – с более высоким риском рецидива и худшим прогнозом [4, 5].

Согласно крупным исследованиям, частота pCR после НАХТ ТНРМЖ невысока и колеблется от 30 до 40% [6–10], а “золотой стандарт” химиотерапии не выработан [6]. При значительном количестве доступных схем и химиотерапевтических средств одной из проблем НАХТ остается эмпирический выбор лечения. Учитывая, что цитостатические препараты снижают качество жизни пациентов, а при их использовании достигается

ограниченный терапевтический эффект, отказ от потенциально неэффективного лечения может служить лучшим терапевтическим решением. Задача состоит в том, чтобы идентифицировать маркеры, которые могли бы заранее предсказать ответ на химиотерапию и помочь снизить побочные эффекты и стоимость лечения, помогая определить терапевтическую стратегию. Изучение молекулярно-генетических профилей опухолей поможет индивидуализировать выбор химиотерапевтических препаратов и снизить риск побочных эффектов [11].

Существующие в настоящее время панели молекулярно-генетических маркеров, такие как Oncotype DX [12], Prosigna [13], MammaPrint [14], EndoPredict [15], BluePrint [16], позволяют прогнозировать ответ на адъювантную терапию. Что касается неоадъювантной терапии, все эти панели показали лучшие показатели прогностической ценности при люминальных подтипах РМЖ, чем при ТНРМЖ [13, 16–20]. Таким образом, задача уточнения прогноза ответа ТНРМЖ на НАХТ путем анализа биопсийного материала, полученного до лечения, по-прежнему остается актуальной в современной медицинской практике.

Все перечисленные выше прогностические панели включают в себя маркеры экспрессии генов. В качестве дополнительного и в некоторой степени альтернативного источника прогностических маркеров мы рассматриваем метилотипирование злокачественных опухолей. Профили метилирования ДНК опухолевых геномов уже использовались нами и другими авторами для создания классификаторов эпигенетических подтипов РМЖ [21, 22].

Эффективный и беспристрастный поиск эпигенетических маркеров, позволяющих различать группы сравниваемых клинических образцов, возможен только на основе широкогеномного скрининга дифференциального метилирования, прежде всего на основе секвенирования ДНК. Хотя полногеномное бисульфитное секвенирование (WGBS) теоретически предоставляет наибольшую информацию о метилировании ДНК-генома, в настоящее время вряд ли это метод выбора при разработке маркеров метилирования ДНК. Бисульфитное секвенирование ограниченных выборок локусов (RRBS), направленное преимущественно на регуляторные участки генома, такие как CpG-островки, позволяет гораздо более рентабельно проводить скрининг дифференциально метилированных участков, представляющих собой потенциальные диагностические маркеры.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клинический материал

В исследование включены материалы биоптатов опухолей от 34 пациенток (табл. 1) с инвазивным ранним ($T_{1-2}N_{0-1}M_0$) и местнораспространенным ($T_{3-4}N_{0-3}M_0$ либо $T_{1-4}N_{2-3}M_0$) РМЖ трижды нега-

тивного подтипа, степени злокачественности 2 и 3, которые лечились в ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” и в ГБУ Рязанской обл. “Областной клинический онкологический диспансер” в 2015–2018 гг., а также шесть аутопсийных непарных образцов нормальных тканей молочной железы со средним возрастом 30.5 лет. Средний возраст женщин с РМЖ составил 47.82 ± 10.07 года (табл. 1). От каждого участника исследования получено письменное информированное согласие. Все пациентки прошли 7–8 курсов НАХТ по схеме доксорубин + цисплатин + паклитаксел. Лечение проводилось в рамках протоколов, разработанных в ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина” и в ГБУ Рязанской обл. “Областной клинический онкологический диспансер”. Материалы биопсии, полученные от пациенток до начала НАХТ, помещали в раствор IntactRNA (Евроген, Россия) и хранили при -20°C (после 24 ч инкубации при 4°C) до выделения ДНК. Пациентки были разделены на две группы: ответившие на НАХТ (pCR) и не ответившие на НАХТ (остаточная опухоль).

Экстракция ДНК

Геномную ДНК из биопсийных образцов выделяли по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Широкогеномный анализ метилирования ДНК

Широкогеномное бисульфитное секвенирование ДНК проводили по ранее описанной нами технологии XmaI-RRBS [23] на секвенаторе Ion Torrent PGM (Thermo Fisher Scientific, США).

ДНК обрабатывали эндонуклеазой рестрикции XmaI, затем проводили частичное тупление липких концов метилированными цитозинами с использованием 3'–5' экзофрагмента Кленова и лигирование с адаптерами, содержащими метилированные остатки цитозина. Полученные таким образом библиотеки фрагментов ДНК селектировали по длине для получения фракции фрагментов с размером вставки 100–200 пн и проводили бисульфитную конверсию с использованием набора Qiagen EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Германия). Чтобы избежать неспецифического праймирования 3'-концов фрагментов ДНК в дальнейшей полимеразной реакции, терминировали их с помощью набора SNaPshot Multiplex Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Затем использовали РНКазу А (Sigma-Aldrich, США) и щелочную фосфатазу (SibEnzyme, Россия) для удаления РНК-носителя, используемого в протоколе EpiTect

Таблица 1. Клинико-патологические характеристики исследованных опухолей

Клинико-патологические характеристики		Количество образцов (%)
Возраст пациентки	≤47.82	16 (47.06)
	>47.82	18 (52.94)
Размер опухоли	T0	3 (8.82)
	T1	1 (2.94)
	T2	18 (52.94)
	T3	2 (5.88)
	T4	10 (29.41)
Статус лимфатических узлов	N0	14 (41.17)
	N1	9 (26.47)
	N2	2 (5.88)
	N3	9 (26.47)
Степень злокачественности	G2	15 (44.12)
	G3	19 (55.88)
Подгруппа ТНРМЖ	Ранний (T ₁₋₂ N ₀₋₁ M ₀)	19 (55.88)
	Местнораспространенный (T ₃₋₄ N ₀₋₃ M ₀ либо T ₁₋₄ N ₂₋₃ M ₀)	15 (44.12)
Ответ на НАХТ	pCR	15 (44.12)
	Остаточная опухоль	19 (55.88)

Bisulfite Kit и дефосфорилирования остаточных ddNTP соответственно. Конечные библиотеки амплифицировали с помощью ПЦР, количество циклов которой определяли на основании предварительных измерений методом количественной ПЦР. Полученные библиотеки очищали и количественно оценивали на флуориметре Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты секвенирования обрабатывали с помощью стандартного программного обеспечения Ion Torrent Suite. Для выравнивания полученных прочтений на последовательности генома человека GRCh37/hg19 с помощью выравнивателя Bowtie 2 [24] использовали программное обеспечение Bismark [25].

Определение маркеров-кандидатов in silico для МЧ-ПЦР

Чтобы обеспечить возможность использования панелей маркеров метилирования ДНК в формате метилчувствительной ПЦР (МЧ-ПЦР), мы разработали алгоритм дизайна виртуальных ампликонов на основе данных широкогеномного бисульфитного секвенирования ДНК. Критерии отбора участков генома для включения в качестве маркеров в диагностическую панель на основе МЧ-ПЦР были следующими: количество сайтов узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз BstHNI (GCG/C) и/или HpaII (C/CGG) в ампли-

коне должно быть больше двух, а длина вставки ампликона – не более 100 пн. Диагностическую ценность индивидуальных маркеров метилирования ДНК характеризовали с помощью ROC-анализа [26]. Были выбраны маркеры с площадью под кривой (сvAUC) ≥ 0.75. Рассматривали только такие потенциальные маркеры метилирования, которые расположены в пределах или на расстоянии не более 2 тпн от генов, экспрессирующихся в нормальных тканях молочной железы.

Попарное расстояние между двумя сайтами узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз вычисляли по формуле

$$D = \begin{cases} 0, & \text{if } D_{\text{physical}} < 100 \text{ and } D_{\text{manhattan}} < 0.1 \\ 1000, & \end{cases}$$

где D – расстояние между двумя сайтами, D_{physical} – физическое расстояние в нуклеотидах между двумя сайтами, $D_{\text{manhattan}}$ – нормированное манхэттенское расстояние между сайтами по значениям уровня метилирования в образцах [27]. Использование метода агломерации “полной связи” позволяет ограничить размер вставки ампликона (максимальное расстояние между двумя сайтами узнавания в ампликоне) заданным ограничением 100 пн.

Классификаторы строили с использованием логистической регрессии с пороговым значением по умолчанию 0.5 для определения полного патоморфологического ответа или остаточной опухоли как результата НАХТ. Для характеристики от-

дельных маркеров и их возможных комбинаций проводили кросс-валидацию с использованием пакета CaretR [28]. Для оценки качества классификации проводили ROC-анализ и строили ROC-кривые с использованием пакета cvAUCR [29]. Наилучшие показатели чувствительности и специфичности классификаторов определяли с помощью индекса Юдена. Все расчеты и графики выполняли с использованием языка программирования для статистической обработки данных R [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Широкогеномное бисульфитное секвенирование образцов ДНК из биоптатов трижды негативных опухолей молочной железы

Для 34 биоптатов ТНРМЖ, взятых до начала НАХТ, методом XmaI-RRBS получено в среднем 118 млн пн последовательностей с 500000–2000000 прочтений на образце. Средняя эффективность картирования последовательностей ДНК, конвертированной бисульфитом, на референсный геном составила 68%. Измерены уровни метилирования для 187 547 CpG-динуклеотидов, из которых 40981 (21.85%) и 23822 (12.7%) принадлежат сайтам узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз HpaII и BstHNI соответственно. Полученный массив данных размещен в базе данных GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), идентификатор GSE123712.

Дизайн панели из ограниченного количества маркеров для предсказания эффективности НАХТ ТНРМЖ

Полученные результаты широкогеномного анализа метилирования ДНК использовали для идентификации геномных локусов, которые были бы одновременно (1) высокоинформативными с точки зрения различения опухолей, отвечающих и не отвечающих на НАХТ; и (2) потенциально пригодными для оценки с помощью МЧ-ПЦР — наиболее простого метода анализа маркеров метилирования в условиях клинических диагностических лабораторий. Оценка пригодности локуса для анализа методом МЧ-ПЦР проводили по следующим критериям: (1) расстояние между двумя крайними сайтами узнавания чувствительных к метилированию эндонуклеаз рестрикции HpaII и/или BstHNI в пределах потенциальной вставки ампликона — не более 100 пн и (2) наличие в пределах ампликона по крайней мере двух сайтов HpaII и/или BstHNI. Применяв указанные условия, мы получили 64803 CpG-динуклеотида, входящих в 12905 потенциальных ампликонов для дальнейшей разработки диагностических панелей с ограниченным количеством маркеров метилирования ДНК.

Чтобы оценить дискриминативный потенциал отдельных маркеров, выбранных описанным выше способом, мы рассчитали индивидуальную чувствительность, специфичность и площадь под ROC-кривой (cvAUC) для каждого потенциального ампликона скросс-валидацией при 100 случайных разбиениях на обучающую и тестирующую выборки в соотношении 4 : 1. По результатам были отобраны ампликоны, демонстрирующие наилучшее качество классификации (cvAUC \geq 0.75). Кроме того, рассматривали только те ампликоны, которые картируются в пределах или на расстоянии не более 2 тпн от генов, экспрессирующихся в нормальных тканях молочной железы (согласно порталу GTEx: <https://www.gtexportal.org>, дата обращения 15.11.2021). Описанным условиям удовлетворяют семь кандидатных ампликонов (табл. 2), которые были выбраны для дальнейшей разработки диагностической панели на основе маркеров метилирования ДНК.

Для выбора сочетаний ампликонов, обеспечивающих максимально качественную классификацию опухолей, были оценены все возможные комбинации ампликонов, составляющих потенциальные панели маркеров метилирования ДНК. Было получено 120 панелей ампликонов, которые различают опухоли с хорошим и плохим ответом на НАХТ. Значения cvAUC, полученные с использованием кросс-валидации, для 25 панелей с наилучшими потенциальными показателями диагностической ценности показаны на рис. 1, а.

Учитывая малые количества ДНК, доступные для анализа в случае использования в диагностике материала биопсии ткани опухоли, предпочтительным методом анализа метилирования ДНК в клинической лаборатории является МЧ-ПЦР, не требующая бисульфитной конверсии ДНК-этапа, сопряженного со значительными потерями материала. Метод МЧ-ПЦР может быть реализован как в полуколичественном формате — с определением продуктов по конечной точке гель-электрофорезом, так и в количественном формате (МЧ-кПЦР). В первом случае необходимым условием возможности интерпретации результатов является отсутствие метилирования маркерного локуса в одной из двух групп сравнения (например, отсутствие метилирования в норме и наличие аномального метилирования в опухоли). Мы провели оценку уровней метилирования областей покрытия семи ампликонов, выбранных выше для формирования панелей диагностических маркеров, по результатам широкогеномного анализа метилирования XmaI-RRBS. Полученные результаты (рис. 2) показывают, что техническим требованиям для выполнения МЧ-ПЦР в полуколичественном формате соответствуют ампликоны *ANKRD46*, *MXRA5* и *RUSC1/RUSC1-AS1*: локусы *ANKRD46* и *RUSC1/RUSC1-AS1* неметилированы в нормальных тканях молочной железы и в группе pCR, и аномально метилированы в группе с остаточной опухолью; а локус *MXRA5* неметилирован в нормальных тканях молочной железы и в группе с остаточной опухолью и гиперметилирован

Таблица 2. Индивидуальные характеристики виртуальных ампликонов, показавших наилучшее качество классификации ($cvAUC \geq 0.75$) трижды негативных опухолей молочной железы по чувствительности к неоадьювантной химиотерапии

Расположение и границы ампликона		Количество образцов с данными XmaI-RRBS		Средние уровни метилирования		ROC-характеристики индивидуальных ампликонов				Кол-во сайтов HpaII и/или BstNHI
ген	координаты, GRCh37/hg19	в группе с pCR	в группе с остаточной опухолью	в группе с pCR	в группе с остаточной опухолью	cvAUC	чувствительность, %	специфичность, %	точность, %	
<i>APCDD1L</i>	chr20: 57042425–57042462	13	17	0.72	0.88	0.78	62.2	88.9	77.1	6
<i>RUSC1_RUSC1-AS1</i>	chr1: 155294112–155294133	13	14	0.01	0.06	0.78	84.2	73.1	78.0	3
<i>MYO15B</i>	chr17: 73584085–73584171	13	15	0.11	0.41	0.77	76.3	80.3	78.6	4
<i>EXOC2</i>	chr6: 694648–694740	12	16	0.91	0.97	0.77	89.7	58.9	72.5	4
<i>THBS2</i>	chr6: 169634923–169634948	13	16	0.98	0.92	0.75	60.8	84.9	74.3	4
<i>MXRA5</i>	chrX: 3263383–3263461	13	17	0.14	0.04	0.75	73.4	70.0	71.5	4
<i>ANKRD46</i>	chr8: 101571816–101571913	13	16	0.02	0.07	0.75	77.4	68.3	72.3	3

Таблица 3. Параметры логистической регрессии для панели маркеров метилирования *ANKRD46*, *MXRA5* и *RUSC1/RUSC1-AS1* с точки зрения предсказания эффективности неоадьювантной химиотерапии трижды негативных опухолей молочной железы

Фактор	Значение коэффициента в модели (SD)
B_0 (свободный коэффициент)	–1.66 (± 1.02)
<i>RUSC1/RUSC1-AS1</i>	60.83 (± 35.34)
<i>MXRA5</i>	–1.84 (± 5.87)
<i>ANKRD46</i>	27.51 (± 16.98)

в группе pCR. Значения cvAUC панелей, составленных из этих ампликонов, показаны на рис. 1, б.

Результаты ROC-анализа и параметры логистической регрессии для панели, включающей одновременно маркеры метилирования *ANKRD46*, *MXRA5* и *RUSC1/RUSC1-AS1* представлены на рис. 3 и в табл. 3 соответственно.

Гены *APCDD1L*, *RUSC1/RUSC1-AS1*, *MYO15B*, *EXOC2*, *THBS2*, *MXRA5* и *ANKRD46*, уровни метилирования которых показали в нашем исследовании наилучшее качество классификации трижды негативных опухолей молочной железы по чувствительности к неоадьювантной химиотерапии, ранее изучались в контексте вовлеченности нарушений их экспрессии в этиопатогенез злокачественных новообразований и возможностей ис-

пользования в качестве диагностических маркеров в онкологии. Так, экспрессия *APCDD1L* рассматривается как высокоинформативный маркер выживаемости при 12 различных типах рака [31]. Для гена *RUSC1-AS1* была показана высокая экспрессия в тканях и клеточных линиях рака молочной железы, способствующая прогрессированию опухолей посредством взаимодействия с *CDKN1A* и *KLF2*. Уровень *RUSC1-AS1* положительно коррелировал с размером опухоли и клиническими стадиями и отрицательно коррелировал с выживаемостью пациенток с РМЖ [32]. *THBS2* представляет собой секретируемый гомотримерный гликопротеин, который принадлежит к семейству тромбоспондинов и опосредует взаимодействия клеток между собой и с межклеточным матриксом. По данным Cancer Genet-

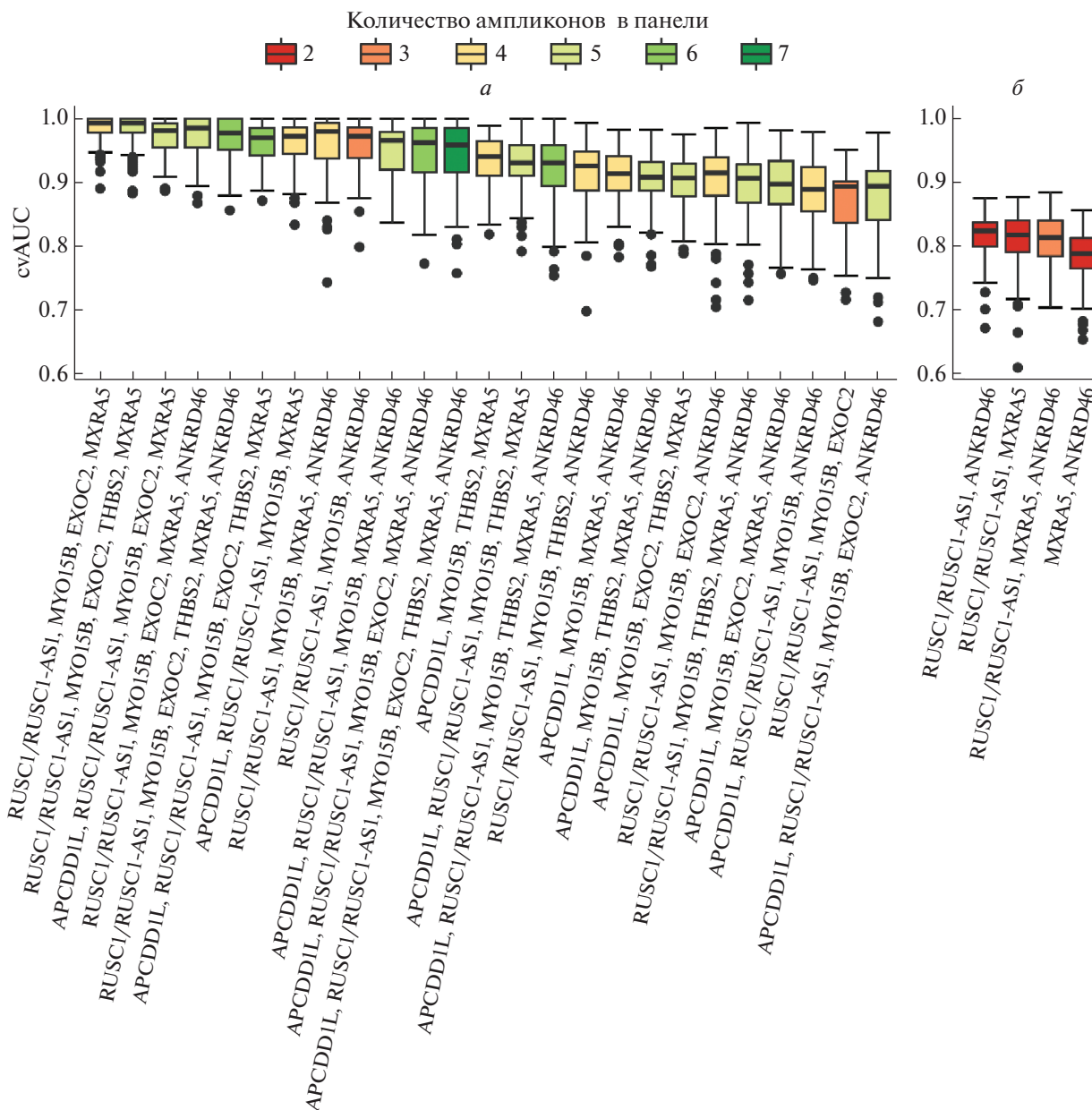


Рис. 1. *a* – значения cvAUC (AUC, полученные с использованием кросс-валидации) для 25 лучших комбинаций ампликонов в рамках панелей маркеров метилирования ДНК для предсказания чувствительности трижды негативного рака молочной железы к НАХТ. *б* – значения cvAUC для панелей, состоящих из маркеров, удовлетворяющих требованиям метилчувствительной ПЦР. По оси абсцисс – различные комбинации ампликонов. Медианные значения cvAUC обозначены горизонтальными черными линиями в прямоугольниках.

icsWeb, THBS2 – мощный ингибитор роста опухоли и ангиогенеза [33]. MXRA5 – один из белков, вовлеченных в ремоделирование матрикса. Для гена *MXRA5* выявлена высокая частота мутаций при ТНРМЖ – значимо выше, чем при раке молочной железы в целом (точный тест Фишера, $P = 0.04$) [34]. В одном из исследований были выявлены различия в метилировании гена *MXRA5* между пограничными и злокачественными филоидическими опухолями (редкими опухолями молочной железы) [35]. М. Reingold с соавт. об-

наружили снижение экспрессии гена *MXRA5* в метастазах РМЖ по сравнению с первичной опухолью [36].

ANKRD46 – однопроходный мембранный белок с неясной функцией. Было показано, что важным регулятором мРНК *ANKRD46* и уровня белка ANKRD46 в клетках РМЖ является miR-21. В свою очередь miR-21 подавляет рост и пролиферацию клеток РМЖ [37]. Таким образом, эпигенетическая регуляция гена *ANKRD46* может быть важным звеном в процессах канцерогенеза.

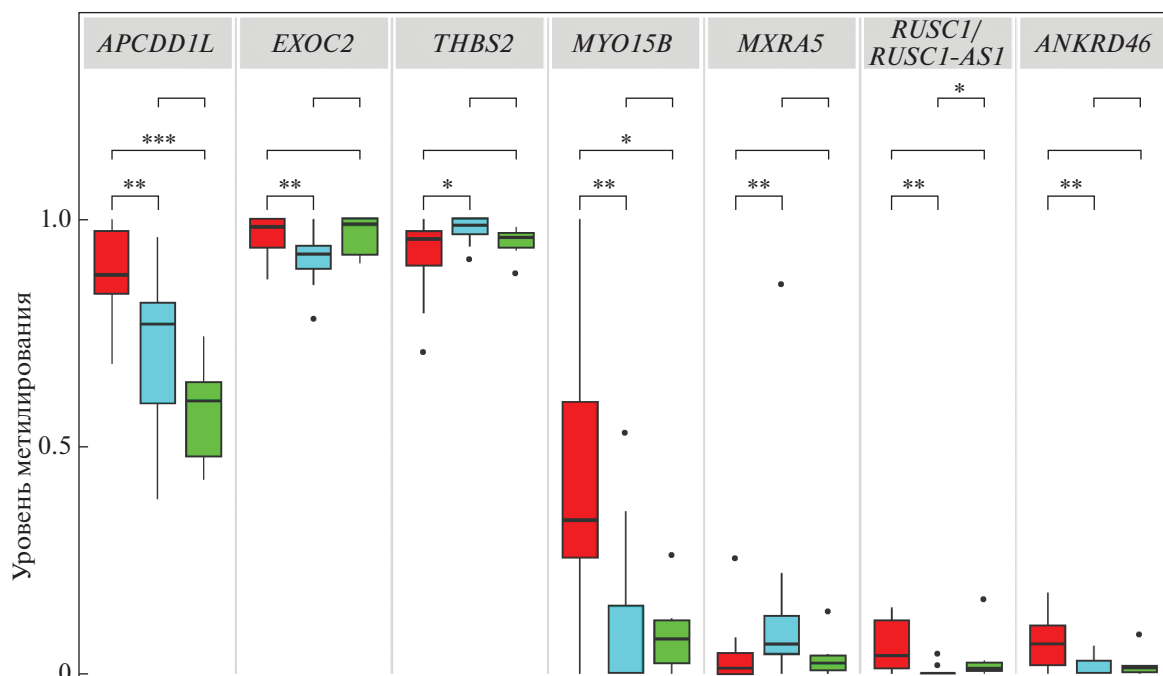


Рис. 2. Уровни метилирования (по ординате) семи ампликонов, выбранных в настоящей работе для формирования панелей маркеров метилирования ДНК, различающих ответ трижды негативных опухолей молочной железы на НАХТ. Красные, голубые и зеленые прямоугольники – группы образцов опухолей с остаточной опухолью, с pCR и образцов ткани нормальной молочной железы соответственно. Различия в уровне метилирования между группами (*U*-критерий Манна–Уитни): * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

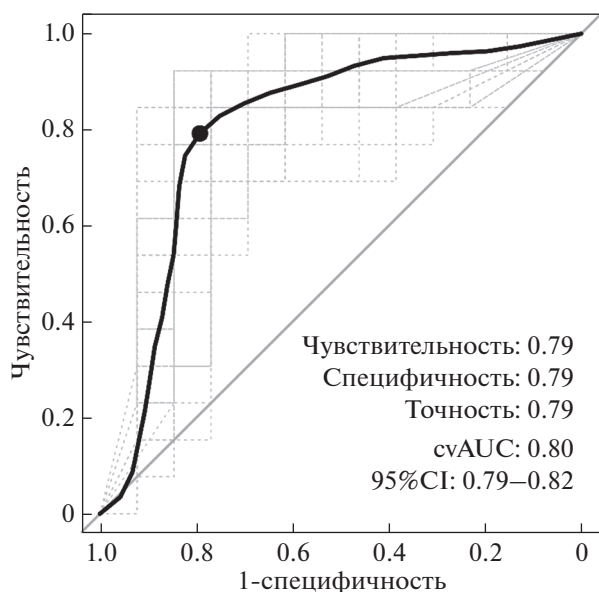


Рис. 3. ROC-характеристики панели, включающей маркеры метилирования *ANKRD46*, *MXRA5* и *RUSC1/RUSC1-AS1*.

Обращает на себя внимание тот факт, что анализ данных проекта TCGA-BRCA выявил связь между амплификацией *ANKRD46* и гистологической стадией инвазивной протоковой карциномы [38].

Таким образом, для ряда маркеров из нашего набора другими авторами также выявлены ассоциации с особенностями фенотипа опухоли и/или ее чувствительности к химиотерапии. Это наблюдается несмотря на непредвзятый отбор (на основании результатов широкогеномного анализа метилирования ДНК) маркеров чувствительности РМЖ к НАХТ, проведенный нами в рамках настоящего исследования. Данное наблюдение позволяет ожидать, что формируемые нами системы маркеров аномального метилирования ДНК для определения потенциальной чувствительности опухолей молочной железы к НАХТ покажут высокую диагностическую ценность в клинических испытаниях. Поскольку они не только базируются на наиболее информативных маркерах, непредвзято выявленных в разведочной выборке, но и ассоциированы с биологическими функциями, нарушения которых могут приводить к изменению ответа опухолей на химиотерапию.

Авторы благодарят Центр коллективного пользования (ЦКП) “Геном” ФГБНУ “МГНЦ” за помощь в выполнении высокопроизводительного секвенирования ДНК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 18-15-00430, <https://rscf.ru/project/18-15-00430>.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стан-

дартам институционального и/или национально-го комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Echeverria G.V., Ge Z., Seth S. et al.* Resistance to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer mediated by a reversible drug-tolerant state // *Sci. Translational Med.* 2019. V. 11. № 488. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav0936>
2. *Schmid P., Cortes J., Pusztai L. et al.* Pembrolizumab for early triple-negative breast cancer // *New Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 9. P. 810–821. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910549>
3. *Pandy J.G.P., Balolong-Garcia J.C., Cruz-Ordinario M.V.B., Que F.V.F.* Triple negative breast cancer and platinum-based systemic treatment: a meta-analysis and systematic review // *BMC Cancer.* 2019. V. 19. № 1. P. 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-6253-5>
4. *Penault-Llorca F., Viale G.* Pathological and molecular diagnosis of triple-negative breast cancer: A clinical perspective // *Ann. Oncol.* 2012. V. 23. P. vi19–vi22. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds190>
5. *Carey L.A., Dees E.C., Sawyer L. et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 8. P. 2329–2334. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1109>
6. *Weiss A., Bashour S.I., Hess K. et al.* Effect of neoadjuvant chemotherapy regimen on relapse-free survival among patients with breast cancer achieving a pathologic complete response: An early step in the de-escalation of neoadjuvant chemotherapy // *Breast Cancer Res.* 2018. V. 20. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-0945-7>
7. *Gamucci T., Pizzuti L., Sperduti I. et al.* Neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: A multicentric retrospective observational study in real-life setting // *J. Cell. Physiol.* 2018. V. 233. № 3. P. 2313–2323. <https://doi.org/10.1002/jcp.26103>
8. *Sikov W.M., Berry D.A., Perou C.M. et al.* Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance) // *J. clinical oncology.* 2015. V. 33. № 1. P. 13. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.0572>
9. *Lee H.J., Park I.A., Song I.H. et al.* Comparison of pathologic response evaluation systems after anthracycline with/without taxane-based neoadjuvant chemotherapy among different subtypes of breast cancers // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 9. P. e0137885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137885>
10. *Biswas T., Efirid J.T., Prasad S. et al.* The survival benefit of neoadjuvant chemotherapy and pCR among patients with advanced stage triple negative breast cancer // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 68. P. 112712. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22521>
11. *Fasching P.A., Gaß P., Hein A.* Neoadjuvant treatment of breast cancer—advances and limitations // *Breast Care.* 2016. V. 11. № 5. P. 313. <https://doi.org/10.1159/000452463>
12. *Paik S., Shak S., Tang G. et al.* A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer // *New Engl. J. Med.* 2004. V. 351. № 27. P. 2817–2826. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041588>
13. *Prat A., Galvan P., Jimenez B. et al.* Prediction of response to neoadjuvant chemotherapy using core needle biopsy samples with the prosigna assay // *Clin. Cancer Res.* 2016. V. 22. № 3. P. 560–566. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0630>
14. *Van't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J. et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer // *Nature.* 2002. V. 415. № 6871. P. 530–536. <https://doi.org/10.1038/415530a>
15. *Filipits M., Rudas M., Jakesz R. et al.* A new molecular predictor of distant recurrence in ER-positive, HER2-negative breast cancer adds independent information to conventional clinical risk factors // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 18. P. 6012–6020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0926>
16. *Whitworth P., Stork-Sloots L., de Snoo F.A. et al.* Chemosensitivity predicted by Blue Print 80-gene functional subtype and Mamma Print in the prospective Neoadjuvant breast registry symphony trial (NBRST) // *Ann. of Surgical Oncol.* 2014. V. 21. № 10. P. 3261–3267. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-3908-y>
17. *Dubsky P.C., Fesl C., Singer C. et al.* The EndoPredict score predicts residual cancer burden after neoadjuvant chemotherapy and after neoadjuvant endocrine therapy in HR+/HER2-breast cancer patients from ABCSG 34 // *Proc. of the General Session Abstracts. Am. Association for Cancer Res.* 2018. V. 78. № 4. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.SABCS17-GS6-04>
18. *Nunes R., De Snoo F., Stork-Sloots L. et al.* Race and response to neoadjuvant chemotherapy according to MammaPrint risk // *J. Clin. Oncol.* 2019. V. 37. P. 578–578. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.578
19. *Pease A.M., Riba L.A., Gruner R.A. et al.* Oncotype DX® recurrence score as a predictor of response to neoadjuvant chemotherapy // *Ann. of Surgical Oncol.* 2019. V. 26. № 2. V. 366–371. <https://doi.org/10.1245/s10434-018-07107-8>
20. *Bertucci F., Finetti P., Viens P., Birnbaum D.* EndoPredict predicts for the response to neoadjuvant chemotherapy in ER-positive, HER2-negative breast cancer // *Cancer Letters.* 2014. V. 355. № 1. P. 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.014>
21. *Tanas A.S., Sigin V.O., Kalinkin A.I. et al.* Genome-wide methylotyping resolves breast cancer epigenetic heterogeneity and suggests novel therapeutic perspectives // *Epigenomics.* 2019. V. 11. № 6. P. 605–617. <https://doi.org/10.2217/epi-2018-0213>
22. *Stefansson O.A., Moran S., Gomez A. et al.* A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes // *Mol. Oncol.* 2015. V. 9. № 3. P. 555–568. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.10.012>
23. *Tanas A.S., Borisova M.E., Kuznetsova E.B. et al.* Rapid and affordable genome-wide bisulfite DNA sequencing by XmaI-reduced representation bisulfite sequencing // *Epigenomics.* 2017. V. 9. № 6. P. 833–847. <https://doi.org/10.2217/epi-2017-0031>

24. Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat. Methods* 2012. V. 9. P. 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
25. Krueger F., Andrews S.R. Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications // *Bioinformatics*. 2011. V. 27. № 11. P. 1571–1572. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>
26. Yang S., Berdine G. The receiver operating characteristic (ROC) curve // *Southwest Respir. Crit. Care Chronicles* 2017. V. 5. P. 34–36. <https://doi.org/10.12746/swrccc.v5i19.391>
27. Clifford H., Wessely F., Pendurthi S., Emes R.D. Comparison of clustering methods for investigation of genome-wide methylation array data // *Front. Genet.* 2011. V. 2. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00088>
28. Kuhn M. Building predictive models in R using the caret package // *J. Stat. Software*. 2008. V. 28. № 1. P. 1–26. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i05>
29. LeDell E., Petersen M., van der Laan M., LeDell M. Package ‘cvAUC’. January 17, 2022. <https://cran.r-project.org/web/packages/cvAUC/cvAUC.pdf>
30. R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
31. Vasaikar S.V., Straub P., Wang J., Zhang B. LinkedOmics: Analyzing multi-omics data within and across 32 cancer types // *Nucl. Ac. Res.* 2018. V. 46. № D1. P. D956–D963. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1090>
32. Hu C.C., Liang Y.-W., Hu J.-L. et al. LncRNA RUSC1-AS1 promotes the proliferation of breast cancer cells by epigenetic silencing of KLF2 and CDKN1A // *Eur. Rev. Med. and Pharmacol. Sci.* 2019. V. 23. № 15. P. 6602–6611. https://doi.org/10.26355/eurev_201908_18548
33. Cotterill S. THBS2, Cancer Genetics Web. <http://www.cancer-genetics.org/THBS2.htm>
34. Wang X. Explore genomic profiles for triple-negative breast cancer to discover drug targets // *Oncogenomics*. 2019. P. 423–440. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004321>
35. Collins L.C. Contemporary classification of breast cancer // *Pathology*. 2018. V. 50. P. S8–S9. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.12.018>
36. Reyngold M., Turcan S., Giri D. et al. Remodeling of the methylation landscape in breast cancer metastasis // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. P. e103896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103896>
37. Yan L.X., Wu Q.N., Zhang Y. et al. Knockdown of miR-21 in human breast cancer cell lines inhibits proliferation, in vitro migration and in vivo tumor growth // *Breast Cancer Res.* 2011. V. 13. № 1. P. 1–14. <https://doi.org/10.1186/bcr2803>
38. Ping Z., Xia Y., Shen T. et al. A microscopic landscape of the invasive breast cancer genome // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 1. P. 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep27545>

Design of Marker Panels for Prediction of Neoadjuvant Chemotherapy Response of Triple-Negative Breast Tumors Based on the Results of Genome-Wide DNA Methylation Screening

A. I. Kalinkin^a, V. O. Sigin^a, E. O. Ignatova^b, M. A. Frolova^b, E. B. Kuznetsova^{a, c},
I. Y. Vinogradov^d, M. I. Vinogradov^e, I. I. Vinogradov^{d, e}, M. V. Nemtsova^{a, c},
D. V. Zaletaev^{a, c}, A. S. Tanas^a, and V. V. Strelnikov^{a, *}

^aResearch Centre for Medical Genetics, Moscow, 115522 Russia

^bBlokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia

^cSechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia

^dRegional Clinical Oncology Dispensary, Ryazan, 390046 Russia

^eRyazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia

*e-mail: vstrel@list.ru

The rate of complete pathomorphological response to neoadjuvant chemotherapy (NACT) in triple-negative breast cancer is low and ranges from 30 to 40%. At the same time, to date, there are practically no predictive markers of the effectiveness of NACT for this subtype of tumors. We suggest an approach to the identification of prognostic epigenetic markers of the sensitivity of triple-negative breast tumors to NACT, which can be diagnosed using methylation sensitive PCR. We have selected markers from the XmaI-RRBS genome-wide bisulfite DNA sequencing dataset performed for tumor biopsies obtained from 34 patients before the initiation of NACT, and for 6 samples of normal breast tissue. The patients were divided into groups of responders (complete pathological response) or non-responders (presence of residual tumor). CpG dinucleotides were identified, the differential methylation of which distinguish samples of triple-negative tumors with different sensitivity to NACT, and a panel of methylation markers was developed, including regions of CpG islands of the *RUSC1/RUSC1-AS1*, *MXRA5*, and *ANKRD46* genes, the design of which meets the requirements for the test systems based on methylation sensitive PCR. The estimated diagnostic accuracy of a panel of these three methylation markers is 0.79 (cvAUC = 0.80, 95%CI: 0.79–0.82).

Keywords: triple-negative breast cancer, DNA methylation, genome-wide bisulfite sequencing, XmaI-RRBS, neoadjuvant chemotherapy, methylation sensitive PCR.