

Некоторые клинико-морфологические и молекулярно-генетические аспекты у пациенток с клиническими признаками наследственного рака молочной железы

Юлиана Сергеевна Шатова, Елизавета Александровна Чеботарёва*,
Елена Юрьевна Златник, Инна Арнольдовна Новикова,
Дмитрий Игоревич Водолажский, Елена Алексеевна Дженкова

Ростовский научно-исследовательский онкологический институт, г. Ростов-на-Дону, Россия

Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-224

Цель. Изучить клинико-морфологические и молекулярно-генетические характеристики клинически наследственного рака молочной железы с подтверждённой мутацией и без подтверждённой мутации *BRCA1*, *BRCA2* в сравнении со спорадическим раком молочной железы.

Методы. В исследование была включена 191 пациентка с верифицированным раком молочной железы I–IIa стадии и клиническими признаками наследственного рака молочной железы. В целях выявления мутаций в генах *BRCA1/2* выполняли молекулярно-генетический анализ дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) из лейкоцитов периферической крови.

Результаты. Суммарная частота мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* составила 14,1% общего числа обследованных пациенток. Наиболее часто встречающаяся мутация при клинически наследственном раке молочной железы у жителей Ростовской области — 5382insC в гене *BRCA1*, что соответствует общероссийским данным. Были выявлены также общие отличительные черты наследственного рака молочной железы в сравнении со спорадическим раком молочной железы: молодой возраст на момент манифестации заболевания, высокая частота тройного негативного рака, бесплодие в анамнезе, повышенный уровень экспрессии p53 и рецепторов андрогенов, сниженное содержание анеуплоидных клеток и индекс пролиферации в опухоли.

Вывод. По ряду клинико-морфологических и молекулярно-генетических показателей клинически наследственный рак молочной железы отличается от спорадического рака молочной железы. Данные показатели могут быть в перспективе использованы как критерии для отбора больных клинически наследственным раком молочной железы без подтверждённой мутации *BRCA1/2* по стандартной панели для более углублённого генетического обследования.

Ключевые слова: клинически наследственный рак молочной железы, *BRCA1*, *BRCA2*.

Some clinical morphological and molecular genetic aspects in patients with clinical signs of hereditary breast cancer

Yu.S. Shatova, E.A. Chebotareva, E.Yu. Zlatnik, I.A. Novikova, D.I. Vodolazhskiy, E.A. Dzhenkova
Rostov Research Institute of Oncology, Rostov-on-Don, Russia

Aim. To study the clinical morphological and molecular genetic characteristics of clinically hereditary breast cancer with and without verified mutation of *BRCA1*, *BRCA2* compared to sporadic breast cancer.

Methods. The study included 191 female patients with verified breast cancer stage I–IIA and clinical signs of hereditary breast cancer. In order to identify mutations in genes *BRCA1/2* molecular genetic analysis of deoxyribonucleic acid from peripheral blood leukocytes was performed.

Results. The total frequency of mutations in the genes *BRCA1* and *BRCA2* amounted 14.1% of the total number of examined patients. The most common mutation in clinically hereditary breast cancer among residents of the Rostov Region was 5382insC in *BRCA1* gene, which corresponds to the nationwide data. Also common features of hereditary breast cancer compared to sporadic breast cancer were identified: young age at the time of disease manifestation, high prevalence of triple-negative cancer, history of infertility, increased level of p53 and androgen receptor expression, decreased level of aneuploid cell and proliferation index in the tumor.

Conclusion. In a number of clinical morphological and molecular genetic parameters, clinically hereditary breast cancer differs from sporadic breast cancer. These indicators in the future can be used as criteria for selection of patients with clinically hereditary breast cancer without confirmed *BRCA1/2* mutation by standard panels for in-depth genetic testing.

Keywords: clinically hereditary breast cancer, *BRCA1*, *BRCA2*.

Рак молочной железы (PMЖ) среди многочисленных заболеваний у представительниц женского пола представляет очень серьёзную проблему из-за очень высокой

заболеваемости и смертности от него [1]. На современном этапе PMЖ нельзя рассматривать как единообразное заболевание [2]. Существуют данные о корреляции

известных клинических и фенотипических различий на уровне экспрессии генов [3].

Ещё в 1980-х годах «наследственный РМЖ» (НРМЖ) был выделен как особая нозологическая единица. Этиопатогенетический механизм развития НРМЖ опосредован нарушениями в генах репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) различной степени пенетрантности [4]. По полученным ранее данным, большинство случаев клинически НРМЖ ассоциировано с мутациями в генах *BRCA1/2* [5, 6].

Кроме того, выделена стандартная панель исследования, включающая тестирование определённых экзонов, мутации в которых наиболее часто встречаются среди европейцев. Разработаны методики полногеномного секвенирования, однако их рутинное применение ограничено высокой стоимостью исследования [7, 8]. Нерешёнными остаются и вопросы применения прогностических маркёров и предикторов у больных клинически НРМЖ в ежедневной практике онколога [9, 10].

В исследование была включена 191 пациентка с верифицированным РМЖ I–IIa стадии и клиническими признаками НРМЖ, которые проходили лечение в Ростовском научно-исследовательском онкологическом институте. Учитывали такие клинические признаки НРМЖ, как первично-множественный процесс (РМЖ и рак яичника — синхронные и метахронные), семейный онкологический анамнез (РМЖ, рак яичника), молодой возраст начала заболевания (до 50 лет), тройной негативный подтип опухоли [11].

В целях выявления мутаций в генах *BRCA1/2* выполняли молекулярно-генетический анализ ДНК из лейкоцитов периферической крови. Для исследования у пациенток забирали периферическую венозную кровь в объёме 5 мл в вакуумные пробирки GreenVac-Tube (Корея) с антикоагулянтом ЭДТА-К2. Лейкоциты выделяли из цельной крови путём гемолиза эритроцитов добавлением 0,84% раствора NH_4Cl в сочетании с последовательным центрифугированием и отмывкой 0,9% раствором NaCl [12]. Геномную ДНК экстрагировали с использованием лизирующего SDS-содержащего буфера в присутствии протеиназы-К и последующей фенол-хлороформной экстракции [13].

Концентрацию полученных препаратов ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием набора

Таблица 1. Исследуемые мутации

Локус	Полиморфизм
<i>BRCA1</i>	185delAG
<i>BRCA1</i>	300T>G (C61G)
<i>BRCA1</i>	2080delA
<i>BRCA1</i>	4153delA
<i>BRCA1</i>	5382insC
<i>BRCA2</i>	6174delT

Quant-iT™ dsDNA High-Sensitivity AssayKit (Invitrogen, США). Для наработки ампликонов концентрацию образцов ДНК нормализовывали до величины 2 нг/мкл. Детекцию мутаций проводили с использованием набора «BRCA-скрин» (Интерлабсервис, Россия) методом пиросеквенирования на оборудовании PyroMark Q24 (Qiagen, Germany).

Определяемые мутации в генах *BRCA1/BRCA2* представлены в табл. 1.

По результатам тестирования первую клиническую группу составили 27 больных, у которых была подтверждена мутация генов *BRCA1/2*. Во вторую группу были отобраны 33 пациентки, у которых не была подтверждена мутация генов *BRCA1/2*. Обе группы были сопоставимы по клиническим признакам. Третья группа (контрольная) была сформирована из 30 больных спорадическим РМЖ. Эти группы в дальнейшем изучали в сравнительном аспекте.

Исследования соответствовали установленным этическим стандартам. Для уточнения анамнестических данных осуществляли индивидуальное анкетирование больных. Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование проводили на срезах с парафиновых блоков опухолей, которые предназначались для выполнения стандартного морфологического исследования. Парафиновые срезы депарафинировали и регидратировали по отработанной методике. «Демаскировку» антигенов проводили в PT-Link Thermo. Для визуализации ИГХ-реакции использовали систему детекции Reveal Polyvalent HRP-DAB Detection System.

Срезы докрашивали гематоксилином Майера, для заключения использовали бальзам Bio-Mount. Оценку полученных результатов окрашивания проводили с применением светового микроскопа Leica (Германия) под увеличением $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$. При помощи Nottingham grading system (Elston and Ellis, 1991) определяли

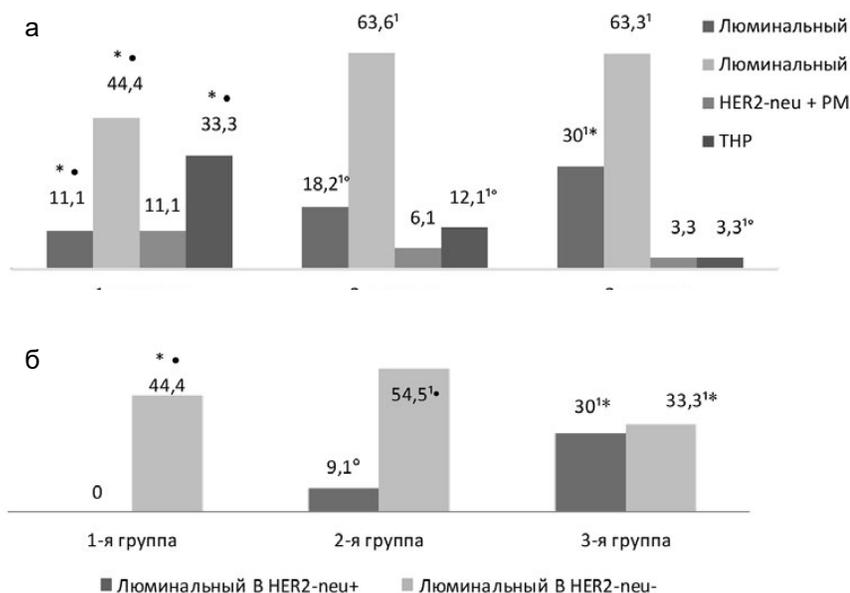


Рис. 1. Распределение больных: а — основных и контрольной групп по биотипу опухоли; б — люминальным раком молочной железы (РМЖ) основных и контрольной групп в зависимости от HER2-neu-статуса; статистически значимые различия ($p < 0,05$) относительно: ¹первой группы; *второй группы; °третьей группы; ТНР — тройной негативный подтип опухоли

гистологическую степень злокачественности опухоли, а также рецепторы прогестерона, эстрогенов, андрогенов, нормальный и мутантный типы p53, E-кадгерин, Vcl-2, Ki67 и Торо2а.

Материалом для проведения ДНК-проточной цитометрии служили образцы опухолей больных, вошедших в исследование. Для ДНК-анализа в ткани опухоли использовали CycleGEST™PLUS DNA Reagent Kit. При помощи компьютерной программы ModFit LT, которая позволяет анализировать ploидность и распределение клеток опухоли по фазам клеточного цикла и детализировать число клеток в фазах S и G2+M, обрабатывали полученные результаты.

Долю клеток с различным содержанием ДНК на гистограмме вычисляли как процент общего числа исследованных клеток. Опухоль считали диплоидной, если выявлялся один пик, который соответствовал нормальному содержанию ДНК в ядрах клеток. При наличии пиков, отличающихся от диплоидного, опухоль расценивали как анеуплоидную. Для оценки степени анеуплоидии определяли индекс ДНК (ИДНК). Он представляет собой соотношение между значением канала пика G0/G1 опухолевого

образца и значением канала пика G0/G1 нормального (диплоидного) образца. ИДНК диплоидных клеток соответствовал 1,0, следовательно, ИДНК анеуплоидных клеток был больше или меньше 1,0.

Индекс пролиферации вычисляли как суммарное число клеток опухоли, находящихся в S- и G2+M-фазах клеточного цикла [14].

Определение белков CA 15-3 и sHER-2 neu в сыворотке крови проводили с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Для подготовки образцов, постановки и учёта реакции использовали инструкцию к диагностическому набору для определения sHER-2 neu производства Platinum ELISA BMS 207, eBiocience (Австрия) и Вектор-Бест для CA-15-3. Для встряхивания проб использовали орбитальный шейкер для микропланшетов, скорость 600–800 об./мин (Stat FAX 2000, USA), для промывания лунок — автоматическое устройство Аквамарин (Россия), для учёта — фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках при длине волны 450 нм (Униплан, Россия).

Частота герминальных мутаций в исследуемой группе пациенток с клинически

Таблица 2. Частота бесплодия в анамнезе у больных клинических групп

Признак	Первая группа (n=27), абс. (%)	Вторая группа (n=33), абс. (%)	Третья группа (n=30), абс. (%)	p
Всего	6 (22,2%)	2 (6,1%)	—	<0,05
Первичное бесплодие	3 (11,1%)	1 (3%)	—	>0,05
Вторичное бесплодие	3 (11,1%)	1 (3%)	—	>0,05

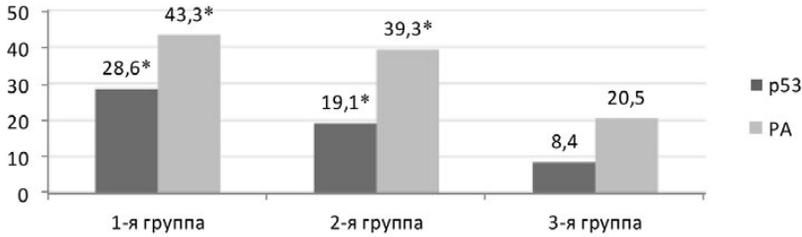


Рис. 2. Частота гиперэкспрессии p53 и рецепторов андрогенов (РА) в опухолях больных клинических групп; *различия достоверны в отношении третьей группы (p <0,05)

НПМЖ составила 27 (13,1%) случаев: *BRCA1* 5382 insC — 25 случаев, *BRCA1* 300T >G — 2 случая. Таким образом, частота и спектр выявленных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* у больных РМЖ в Ростовской области соответствует общероссийским показателям (p >0,05). Нужно отметить, что обе группы больных клинически НПМЖ в сравнении со спорадическим характеризовались достаточно высокой частотой самого неблагоприятного подтипа с клинической точки зрения — тройного негативного подтипа опухоли (рис. 1, а). При этом в первой группе он определялся в 3 раза чаще, чем во второй, а люминальные подтипы — наоборот, в 1,5 раза реже. Также не было выявлено и ассоциации с HER2-neu+-статусом опухоли (рис. 1, б).

Далее освещены только полученные статистически значимые различия. В обеих группах клинически НПМЖ был отмечен относительно высокий уровень бесплодия, как первичного, так и вторичного (табл. 2).

Клинически НПМЖ отличался от спорадического и по ИГХ-показателям: частота гиперэкспрессии p53 выше в 1,3–1,4 раза, рецепторов андрогенов — в 1,9–2,1 раза (p <0,05; рис. 2).

Установлены статистически значимые различия ДНК-цитометрических характеристик клинически НПМЖ и спорадического: снижение среднего содержания анеуплоидных клеток (33,8±6,7 и 31,7±7,1% — против

58,6±6,5% соответственно), снижение индекса пролиферации и диплоидных, и анеуплоидных опухолей: 4,9±1,1 и 13,6±2 клинически НПМЖ *BRCA+* и 3,3±0,9 и 10,6±2,8 клинически НПМЖ *BRCA-* против 7,9±1,7 и 21,5±5,8.

Интересен тот факт, что несмотря на общие черты обеих групп клинически НПМЖ, они имели и ряд отличий по клинико-анамнестическим характеристикам и по ИГХ-данным. Частота бесплодия в первой группе в 3,5 раза превышала аналогичный показатель во второй группе (см. табл. 1), отмечено сниженное количество беременностей и медицинских аборт, более старший возраст на момент первой беременности (табл. 3).

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что больные первой группы достоверно чаще отметили в анамнезе факт приёма пероральных контрацептивов, а также более длительное их применение по сравнению с другими группами (табл. 4). На наш взгляд, эти данные необходимо учитывать при динамическом наблюдении за здоровыми женщинами-носительницами *BRCA*-мутаций, которым, видимо, стоит отказаться от подобной терапии.

При ИГХ-исследовании выявлены различия по уровню экспрессии *BCL2* в *BRCA+* опухоли: повышение в 1,8 раза по сравнению со второй группой (рис. 3).

Наличие мутации в гене *BRCA* у больных РМЖ с большей частотой сопровождалось

Таблица 3. Репродуктивный анамнез больных клинических групп

Показатель	Первая группа (n=27) M±m	Вторая группа (n=33) M±m	Третья группа (n=30) M±m	p
Количество беременностей	3,0±0,39	4,24±0,46	4,3±0,38	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ >0,05
Возраст при первой беременности, годы	25,5±0,67	21,2±0,41	22,4±0,74	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ >0,05
Количество аборт	1,5±0,47	2,41±0,49	2,63±0,40	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ >0,05

Таблица 4. Особенности приема пероральных контрацептивов у больных клинических групп

Показатели	Первая группа (n=27)	Вторая группа (n=33)	Третья группа (n=30)	p
Приём гормональных контрацептивов, абс. (%)	9 (33,4%)	3 (9,1%)	1 (3,3%)	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ >0,05
Длительность приёма контрацептивов, годы	6,7±0,9	2,5±0,9	1,3±0,7	p ₁₋₂ <0,05 p ₁₋₃ <0,05 p ₂₋₃ >0,05

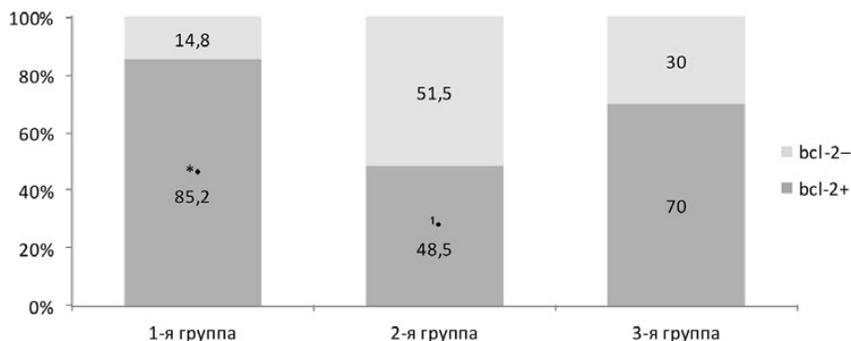


Рис. 3. Частота гиперэкспрессии BCL2 в опухолях больных клинических групп; статистически значимые различия (p <0,05) относительно: ¹первой группы, ^{*}второй группы, [•]третьей группы

присутствием sHER-2/neu (18,62±2,35 нг/мл), чем при клинически НРМЖ *BRCA*- (9,78±0,99 нг/мл) и спорадическом РМЖ (12,09±2,78 нг/мл), и при этом не зависело от подтипа опухоли. С учётом статистически недостоверно более высокой частоты подтипа HER-2/neu+ и отсутствия подтипа HER-2/neu+ люминального В среди больных первой группы происхождение его экстрацеллюлярного домена в сыворотке крови не вполне ясно. Однако по данным литературы можно предположить, что повышение уровня

sHER2 способно предшествовать метастазированию, а также является прогностическим фактором более низкой бессобытийной и общей выживаемости и предиктивным фактором слабого ответа на гормонотерапию и некоторые режимы химиотерапии [15].

ВЫВОДЫ

1. По ряду клинико-морфологических и молекулярно-генетических показателей (молодой возраст на момент манифестации заболевания, высокая частота тройного

негативного подтипа опухоли, наличие бесплодия в анамнезе, повышенный уровень экспрессии p53 и рецепторов андрогенов, сниженное содержание анеуплоидных клеток и индекса пролиферации в опухоли) клинически наследственный рак молочной железы отличается от спорадического рака молочной железы.

2. Данные показатели могут быть в перспективе использованы как критерии для отбора больных клинически наследственным раком молочной железы без подтвержденной мутации *BRCA1/2* по стандартной панели для более углубленного генетического обследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. *Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 г.* М.: Издательская группа РОНЦ. 2014; 226 с. [Davydov M.I., Aksel' E.M. *Statistika zlokachestvennykh novoobrazovaniy v Rossii i stranakh SNG v 2012 g.* (Statistics of malignant neoplasms in Russia and CIS countries in 2012.) Moscow: Izdatel'skaya gruppa RONTs. 2014; 226 p. (In Russ.)]
2. Семиглазов В.Ф., Мерабишвили В.М., Семиглазов В.В. и др. Эпидемиология и скрининг рака молочной железы. *Вопр. онкол.* 2017; 63 (3): 375–384. [Semiglazov V.F., Merabishvili V.M., Semiglazov V.V. et al. Epidemiology and screening for breast cancer. *Voprosy onkologii.* 2017; 63 (3): 375–384. (In Russ.)]
3. Имянитов Е.Н. Общие представления о наследственных опухолевых синдромах. *Практич. онкол.* 2014; 15 (3): 101–106. [Imyanitov E.N. General knowledge about hereditary cancer syndromes. *Practicheskaya onkologiya.* 2014; 15 (3): 101–106. (In Russ.)]
4. Имянитов Е.Н. Биология рака молочной железы. *Практич. онкол.* 2017; 18 (3): 221–231. [Imyanitov E.N. Biology of breast cancer. *Practicheskaya onkologiya.* 2017; 18 (3): 221–231. (In Russ.)]
5. Бит-Сава Е.М., Егоренков В.В., Дамения А.О. и др. Новые подходы в хирургии рака молочной железы. *Практич. онкол.* 2017; 18 (3): 232–245. [Bit-Sava E.M., Yegorenkov V.V., Damentia A.O. et al. New approaches to breast cancer surgery. *Practicheskaya onkologiya.* 2017; 18 (3): 232–245. (In Russ.)]
6. Hung-Wen Lai, Shou-Tung Chen, Dar-Ren Chen et al. Current trends in and indications for endoscopy-assisted breast surgery for breast cancer: Results from a six-year study conducted by the Taiwan Endoscopic Breast Surgery Cooperative Group. *PLoS ONE.* 2017; 11 (3): e0150310. DOI: 10.1371/journal.pone.0150310.
7. Водолажский Д.И., Шатова Ю.С., Комова Е.А., Двядненко К.В. Частота встречаемости *BRCA*-мутаций в Южном Федеральном округе у больных с клиническими признаками наследственного рака молочной железы. *Соврем. пробл. науки и образования.* 2015; (3). [Vodolazhskiy D.I., Shatova Y.S., Komova E.A., Dvadenko K.V. *BRCA* mutations among the patients with clinically hereditary breast cancer in the South Federal state. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2015; (3). (In Russ.)]
8. Ходорович О.С., Снигирёва Г.П., Чхиквадзе В.Д. и др. *BRCA*-ассоциированный рак молочной железы. Случай из практики. *Трудный пациент.* 2016; 14 (10–11): 46–48. [Khodorovich O.S., Snigireva G.P., Chkhikvadze V.D. et al. *BRCA*-associated breast cancer. A case from practice. *Trudnyy patsient.* 2016; 14 (10–11): 46–48. (In Russ.)]
9. Кит О.И., Шатова Ю.С., Новикова И.А. и др. Экспрессия p53 и *BCL2* при различных подтипах рака молочной железы. *Фундаментал. исслед.* 2014; (10): 85–88. [Kit O.I., Shatova Y.S., Novikova I.A. et al. Expression of p53 and *BCL2* in various subtypes of breast cancer. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2014; (10): 85–88. (In Russ.)]
10. Шатова Ю.С., Ващенко Л.Н., Новикова И.А. и др. Экспрессия топоизомеразы-2A и E-кадгерина при различных подтипах рака молочной железы и репродуктивном статусе больных. *Соврем. пробл. науки и образования.* 2015; (3): 156. [Shatova Y.S., Vashchenko L.N., Novikova I.A. et al. Expression of topoisomerase-2A and E-cadherin in different breast cancer subtypes and reproductive status of patients. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2015; (3): 156. (In Russ.)]
11. Brozek I., Cybulska C., Ratajska M. et al. Prevalence of the most frequent *BRCA1* mutations in Polish population. *J. Applied Genetics.* 2011; (52): 325–330. DOI: 10.1007/s13353-011-0040-6.
12. Коган М.И., Чибичан М.Б., Водолажский Д.И. и др. Экспрессия генетических локусов в мононуклеарной фракции периферической крови больных раком предстательной железы. *Онкоурология.* 2012; (4) 40–48. [Kogan M.I., Chibichan M.B., Vodolazhskiy D.I. et al. Expression of genetic loci in mononuclear fraction of peripheral blood of patients with prostate cancer. *Onkourologiya.* 2012; (4) 40–48. (In Russ.)]
13. Корниенко И.В., Водолажский Д.И. Закономерности появления одиночных нуклеотидных замен в гипервариабельных участках контрольного региона митохондриальной ДНК человека. *Молекулярн. биол.* 2010; 44 (3): 439–446. [Kornienko I.V., Vodolazhskiy D.I. Patterns of occurrence of single nucleotide substitutions in the hypervariable parts of the control region of human mitochondrial DNA. *Moleculyarnaya biologiya.* 2010; 44 (3): 439–446. (In Russ.)]
14. Новикова И.А., Шатова Ю.С., Златник Е.Ю. и др. Пролiferативные и иммунологические характеристики молекулярно-биологических подтипов рака молочной железы. *Международ. ж. прикладных и фундаментал. исслед.* 2014; (11): 116–119. [Novikova I.A., Shatova Y.S., Zlatnik E.Y. et al. Proliferative and immunological characteristics of molecular-biological subtypes of breast cancer. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy.* 2014; (11): 116–119. (In Russ.)]
15. Lüftner D., Henschke P., Flath B. et al. Serum HER-2/neu as a prediction and monitoring parameter in a phase II study with weekly paclitaxel in metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 2004; 24 (2B): 895–906. PMID: 15161043.