

На правах рукописи

Лаптиеv
Сергей Александрович

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И КЛИНИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ СНЕК2-, NBS1- И VLM-АССОЦИИРОВАННОГО
НАСЛЕДСТВЕННОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 - онкология

03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург - 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации и в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор **Имянитов Евгений Наумович**

кандидат биологических наук, доцент **Корженевская Марина Анатольевна**

Официальные оппоненты:

Бит-Сава Елена Михайловна - доктор медицинских наук, государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Санкт-Петербургский клинический научно-практический центр специализированных видов медицинской помощи (онкологический)» Министерства здравоохранения Российской Федерации, онкологическое хирургических методов лечения (молочной железы) отделение, заведующая

Раскин Григорий Александрович - доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, отделение патологической анатомии, руководитель

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2020 г. в ____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.052.01 ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России по адресу: 197758, Санкт-Петербург, Песочный, ул. Ленинградская, д. 68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, Санкт-Петербург, Песочный, ул. Ленинградская, д. 68) и на сайте <https://www.niioncologii.ru/science/thesis>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Лариса Валентиновна Филатова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Рак молочной железы (РМЖ) на сегодняшний день является одним из самых частых онкологических заболеваний, диагностируемых у женщин во всем мире. РМЖ представляет собой важную медицинскую проблему в связи с высокой заболеваемостью и смертностью среди женского населения [Каприн А.Д. и соавт., 2017, Любченко Л.Н., Батенева Е.И., 2014]. Наследственный РМЖ относится к разновидностям семейных форм рака, составляющим от 5 до 10% всех случаев РМЖ [Имянитов Е.Н., 2010; Любченко Л.Н., Батенева Е.И., 2014; Lalwani N. et al., 2011].

Огромное внимание к наследственному РМЖ появилось в 1990-х годах, когда были открыты первые гены-супрессоры опухолевого роста *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциированные с этим заболеванием. Соответствующие ферменты - продукты этих генов поддерживают стабильность генома клетки, участвуя в механизмах репарации ДНК [Miki Y. et al., 1994]. Было показано, что опухолевые клетки РМЖ, ассоциированного с мутациями в генах *BRCA1/2*, имеют особые биологические параметры. Уточнение и детализация характеристик опухолевых клеток способствовали пересмотру фундаментальных аспектов данного заболевания. Подобный подход позволил персонализировать системную терапию у пациенток с РМЖ что, в ряде случаев, приводит к отказу от заведомо неэффективного, токсичного и дорогостоящего лечения [Moiseyenko V. M. et al., 2010].

Изучение *BRCA*-негативного семейного РМЖ привело к идентификации новых связанных с этим заболеванием генов: *CHEK2*, *PALB2*, *NBS1*, *PTEN*, *ATM*, *TP53*, *BARD1*, *BLM* и др. [Groer P. et al., 2011], входящих в специализированную систему контроля распознавания повреждений и репарации ДНК. Любые мутационные дефекты выше названных генов могут приводить к дефектной работе системы репарации и генетической нестабильности клеток, предопределяя, таким образом, развитие новообразований.

Особенностью российских пациенток с наследственным РМЖ является относительно высокая частота мутаций в генах *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS1*, *BLM*, и низкая частота мутаций в гене *BRCA2* [Имянитов Е.Н., 2010]. Мутации в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* обладают заметно меньшей пенетрантностью по сравнению с мутациями в генах *BRCA1/2* [Соколенко А.П. и соавт., 2016].

Известно, что ответ пациенток с РМЖ на противоопухолевое лечение отличается большой вариабельностью [Каприн А.Д. и соавт., 2017]. В основе такой гетерогенности лежат индивидуальные различия в молекулярном патогенезе опухолей, обусловленные разнообразным спектром мутаций в «драйверных» генах, запускающих канцерогенез. Изучение молекулярно-биологических характеристик злокачественных клеток, ассоциированных с конкретными мутациями, открывает новые возможности для улучшения результатов лечения и прогноза для жизни пациенток с наследственным РМЖ.

Опухолевые клетки с мутациями в гене *BRCA1* характеризуются высокой чувствительностью к антрациклинам и резистентностью к «золотому стандарту» лечения РМЖ - препаратами из группы таксанов [Byrski T. et al., 2010]. Оказалось, что, таксаны (доцетаксел и паклитаксел) оказывают противоопухолевый эффект через индукцию *BRCA1*-регулируемого апоптоза в раковых клетках, и поэтому дефицит белка *BRCA1* в мутантной клетке приводит к формированию резистентности к этим препаратам [James S.R. et al., 2007]. Показано, что *BRCA1*-мутантные опухолевые клетки молочной железы (МЖ), утратившие оставшийся «нормальный» аллель гена в результате делеции, демонстрируют выраженный дефицит компонентов системы репарации ДНК и проявляют исключительную уязвимость при лечении цитотоксическими препаратами платины (цисплатин), не входящими в стандарты терапии карцином МЖ [Iyevleva A.G. et al., 2016, Moiseyenko V. M. et al., 2010]. Предииктивное значение генетической инактивации *BRCA1* не ограничивается только семейными случаями рака. Показано, что спорадические «трижды негативные» (ER-/PR-/HER2-) РМЖ также характеризуются высокой

чувствительностью к препаратам платины за счет соматической инактивации обоих аллелей гена *BRCA1* [Имянитов Е.Н., 2013].

В отличие от *BRCA1*-ассоциированных карцином МЖ, молекулярные характеристики которых уже достаточно хорошо исследованы, свойства *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ практически не изучались до настоящего времени. Поскольку наследственные мутации в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* нередко встречаются в российской популяции, большую практическую значимость имеет выявление молекулярно-биологических параметров опухолевых клеток и клинической специфичности фенотипа, потенциально пригодных для персонализации терапевтического подхода.

Степень разработанности темы

Основная задача настоящей работы состоит в молекулярно-генетической идентификации *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных случаев РМЖ на дооперационном этапе, получении соответствующих клеточных линий (КЛ) наследственного рака, анализе их молекулярно-биологических параметров, изучении клинических особенностей и лекарственной чувствительности наследственного рака, поскольку возникает насущная потребность в системной оценке эффективности неoadъювантной химиотерапии (НАХТ) у носительниц мутаций вышеуказанных генов по сравнению со случаями спорадического РМЖ. Такое исследование имеет значимый клинический потенциал, так как среди российских женщин с наследственным РМЖ частота наследственных мутаций генов *CHEK2*, *NBS1*, *BLM* весьма высока, и в отношении этой категории больных до сих пор не сформулированы специфические терапевтические рекомендации. Полученные результаты позволят персонализировать лечение, прогноз и подходы к медико-генетическому консультированию среди пациенток с подобными категориями наследственного РМЖ.

Цель исследования

Основной целью явилось выявление молекулярно-генетических, биологических параметров и клинических особенностей РМЖ, детерминированных наследственными мутациями в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*, которые распространены в российской популяции.

Задачи исследования

1. Провести молекулярно-генетическую идентификацию часто встречающихся мутаций в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* для формирования групп пациенток с наследственным РМЖ, включая больных с известным результатом неoadъювантного лечения.
2. Получить клеточные культуры *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных опухолей МЖ, пригодные для анализа химиочувствительности данных категорий наследственного рака.
3. Изучить молекулярно-биологические параметры и клинические особенности РМЖ среди носительниц мутаций в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*.
4. Изучить особенности спектра лекарственной чувствительности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных карцином молочной железы на выборках пациенток, получавших неoadъювантное лечение.

Научная новизна

Выявлены молекулярно-биологические параметры и клинические особенности наследственных форм РМЖ, обусловленные нередко встречающимися мутациями в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*. Даны сравнительные характеристики клинических особенностей: возраст манифестации заболевания, размер опухоли, вовлечение в патологический

процесс регионарных лимфатических узлов, гистологический и молекулярный подтипы рака. Отработаны протоколы перевивки культур клеток первичных опухолей наследственного *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ и дана характеристика их лекарственной чувствительности.

Научно-практическое значение работы

В ходе выполнения работы получены новые данные о молекулярно-биологических и клинических особенностях нередко встречающихся генетических разновидностей наследственного РМЖ, которые позволяют улучшить качество лечения и прогноз для жизни больных РМЖ за счет индивидуального подбора наиболее эффективных терапевтических препаратов.

Методология и методы исследования

Были изучены клиничко-биологические особенности и спектр лекарственной чувствительности наследственных *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных форм РМЖ. Исследование состояло из нескольких этапов, на каждом из которых использовалось достаточное для получения статистически значимых результатов число пациенток, предусмотрены необходимые для обоснования полученных результатов контрольные группы больных.

На первом этапе путем аллель-специфической полимеразной цепной реакции был проведен молекулярно-генетический скрининг среди пациенток с РМЖ с целью идентификации мутаций в «драйверных» генах. Полученный во время оперативного лечения пациенток с наследственным РМЖ, материал опухоли использовался для создания КЛ и их дальнейшей молекулярно-биологической характеристики с помощью иммуноцитохимического анализа. На выборке пациенток с *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированным РМЖ были изучены молекулярно-генетические и клинические параметры наследственных опухолей. Среди пациенток, получавших дооперационную лекарственную терапию, была оценена частота объективного клинического ответа на проводимое противоопухолевое лечение в соответствии с критериями RECIST 1.1, что характеризует химиочувствительность *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ.

Полученные результаты исследования обобщены, подвергнуты анализу и сопоставлены с результатами, описанными в мировой литературе.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Показано, что *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-опосредованные карциномы молочной железы имеют определённые молекулярно-биологические параметры и клинические особенности:

А. *CHEK2*-ассоциированные карциномы, по сравнению со всеми остальными разновидностями РМЖ, характеризуются:

(а) преобладанием позитивного статуса экспрессии рецепторов эстрогенов;

(б) сниженной частотой экспрессии рецептора прогестерона;

(в) более поздним возрастом манифестации заболевания по сравнению с другими формами наследственного РМЖ, детерминированными мутациями в генах *NBS1* и *BLM*;

(г) повышенной частотой опухолей, распространяющихся на грудную стенку и кожу (Т4);

Б. *NBS1*- и *BLM*-ассоциированные опухоли МЖ существенно не отличаются от спорадических форм РМЖ по своим клиничко-биологическим показателям, таким как: статус экспрессии рецепторов эстрогенов, гиперэкспрессия HER2-рецепторов, средний возраст манифестации заболевания, размер опухоли, вовлечение в патологический процесс регионарных лимфатических узлов, гистологический тип рака.

2. *CHEK2*-ассоциированные карциномы МЖ имеют различную лекарственную чувствительность при применении химиотерапевтических препаратов из

групп антрациклинов и таксанов; более выраженную эффективность демонстрируют препараты таксанового ряда.

3. *BLM*-ассоциированные опухоли и спорадические формы РМЖ, лучше отвечали на лечение стандартными схемами химиотерапии, чем опухоли, опосредованные мутациями в генах *CHEK2* и *NBS1*.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседании кафедры медицинской биологии и генетики ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» МЗ России 11 апреля 2017 г., а также на «II Conference to the International Day of DNA «Modern biotechnologies for science and practice» (25 апреля 2015 г., Санкт-Петербург), «III Всероссийской 14 Межрегиональной научной сессии молодых ученых и студентов с международным участием «Современное решение актуальных научных проблем медицины» (15-16 марта 2017 г., Нижний Новгород), «Международном конгрессе «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (18-22 июня 2019 г., Санкт-Петербург).

Апробация диссертации состоялась 14 марта 2018 г. на заседании проблемной комиссии №11 «Патология с секцией биологических наук» на кафедре патологической анатомии ФГБОУ ВО «ПСПбГМУ им. акад. И.П. Павлова» МЗ России.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнен обзор отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы, проанализированы данные первичной медицинской документации, составлена база данных и проведена статистическая обработка клинического материала. Автором лично разработан дизайн исследования, проведена экспериментальная работа (выделение ДНК из образцов крови и опухолей пациенток с РМЖ, поиск мажорных мутаций методом аллель-специфической ПЦР с интерпретацией результатов исследования, получение клеточных линий и изучение их химиочувствительности) и составлена программа математико-статистической обработки данных, сформулированы выводы и практические рекомендации.

Соответствие диссертации паспорту научных специальностей

Диссертационная работа «Молекулярно-генетические и клинико-биологические характеристики *CHEK2*-, *NBS1*- И *BLM*-ассоциированного наследственного рака молочной железы», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, соответствует специальностям: 14.01.12 - онкология в области изучения этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанных на достижениях генетики, молекулярной биологии, морфологии и других естественных наук (п.2) и 03.02.07 - генетика в области генетики человека и наследственных болезней (п. 17).

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, 4-х основных глав (включая обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение и заключение), практических рекомендаций и списка литературы. Диссертационная работа изложена на 115 страницах машинного текста, включает 15 таблиц и 14 рисунков. Список литературы состоит из 117 источников, в том числе 34 - отечественных и 83 - зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн научного исследования

Было проведено ретроспективно-проспективное изучение молекулярно-генетических, молекулярно-биологических и клинических характеристик наследственных форм РМЖ, а также определение спектра лекарственной чувствительности опухолей. В работе идентифицированы и проанализированы три разновидности наследственного РМЖ: *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированный рак. Исследование состояло из 4-х относительно независимых этапов, каждый из которых включал отдельно сформированные экспериментальные и контрольные группы (Рисунок 1):

- I. Молекулярно-генетическая идентификация *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ.
- II. Получение и молекулярно-биологическая характеристика клеточных культур из карцином МЖ от носительниц наследственных мутаций в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*.
- III. Изучение клиничко-биологических особенностей *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-опосредованных опухолей МЖ.
- IV. Изучение химиочувствительности опухолей МЖ у носительниц мутаций в генах *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*.

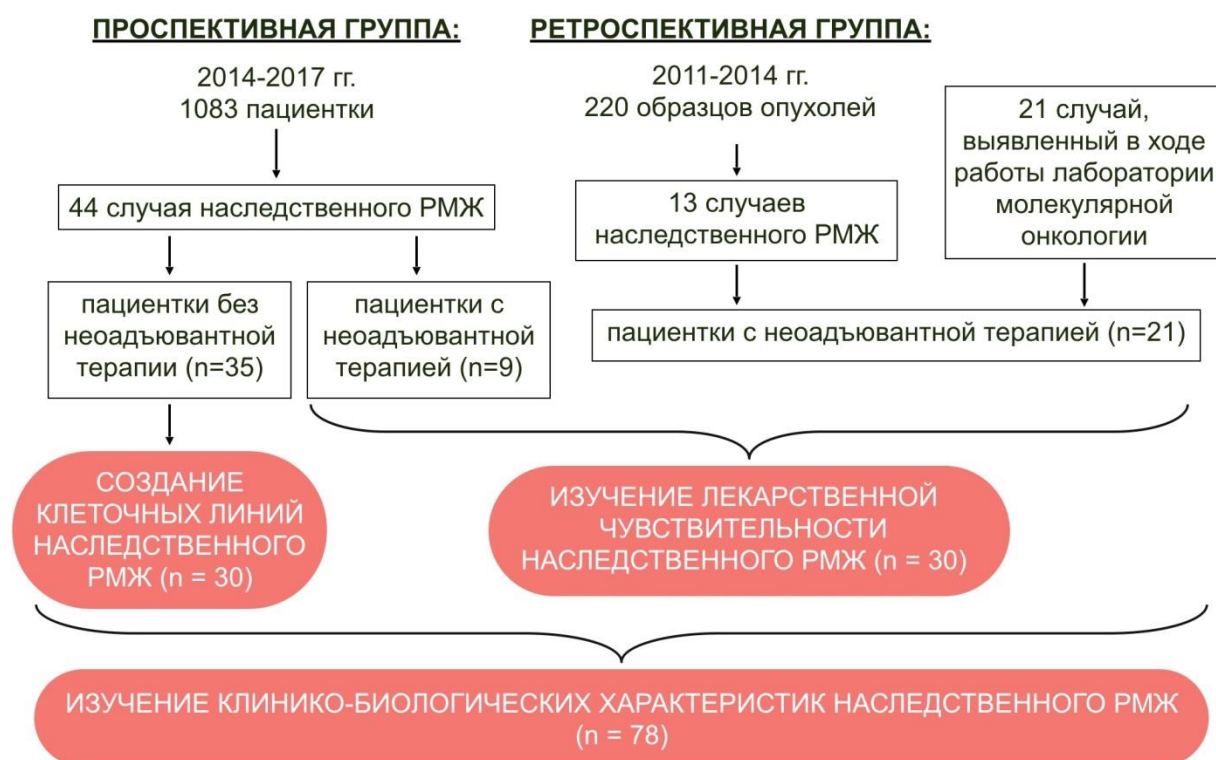


Рисунок 1. Формирование экспериментальной выборки пациенток с РМЖ.

Материалы исследования

Были сформированы и проанализированы проспективные и ретроспективные группы больных, составивших экспериментальную выборку (Рисунок 1). Основным материалом для исследования послужили случаи *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ, выявленные посредством анализа обширных групп пациенток.

1. Проспективный набор материала для исследования. Проспективную группу составили 1083 пациентки с РМЖ, которые были обследованы в Ленинградском областном онкологическом диспансере (ЛООД) и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова в

период с 2014 по 2016 гг. Все пациентки прошли предоперационный молекулярно-генетический скрининг.

На основании дооперационной ДНК-диагностики был произведен отбор 44 больных с наследственным РМЖ, обусловленным мутациями в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*. Все выявленные в ходе проспективного скрининга пациентки с мутациями в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* (n = 44) были включены в исследование молекулярно-биологических и клинических характеристик наследственных форм РМЖ. Пациентки, получавшие НАХТ (n = 9), были включены в анализ лекарственной чувствительности клеток опухолей МЖ. Материал биопсии опухолевой ткани, полученный во время операции у оставшейся группы пациенток (n = 35) без неoadъювантной терапии, использовали для создания клеточных линий (КЛ).

2. Ретроспективная группа. С целью увеличения выборки пациенток с разными типами наследственных мутаций был выполнен молекулярно-генетический анализ архивного патоморфологического материала от больных РМЖ, проходивших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова в период с 2011 по 2014 гг. Для генотипирования были отобраны 220 архивных образцов опухолей от пациенток, получавших НАХТ. Среди них было выявлено 13 женщин-носительниц мутаций в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*. Они были включены в исследование молекулярно-биологических и клинических характеристик указанных категорий наследственного РМЖ и особенностей ответа на химиотерапию.

Для сравнительной оценки результатов лечения использовали контрольную группу спорадического РМЖ, составляющую 105 протестированных пациенток с известным результатом НАХТ, негативных в отношении распространённых наследственных мутаций.

Помимо описанных выше экспериментальных групп пациенток с изучаемыми мутациями «драйверных» генов, в анализ молекулярно-биологических и клинических характеристик разных форм наследственного РМЖ были включены также данные женщин-носительниц мутаций (n = 21), выявленных в ходе диагностической деятельности лаборатории молекулярной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова.

Случаи РМЖ у мужчин, метастатический РМЖ и рак *in situ* не включались в исследование.

Методы исследования

I. Молекулярно-генетическая идентификация *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ.

С целью выявления наследственного характера РМЖ проводили молекулярно-генетический скрининг с помощью ДНК-диагностики. Образцы ДНК из лейкоцитов периферической крови (проспективная группа) и архивных парафиновых блоков (ретроспективная группа) были протестированы на наиболее часто встречающиеся в российской популяции мутации в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *NBS1*, *BLM*.

1. Выделение ДНК из крови. Проводился забор периферической крови у пациенток с РМЖ, выявленных в ходе обследования в условиях поликлиники. Выделение ДНК из лейкоцитов периферической крови выполнялось с помощью коммерческого набора GE Healthcare. В 200-300 мкл крови проводился протеолиз с использованием 20 мкл раствора Proteinase K с последующим лизисом лейкоцитов (Lysis Buffer type 10) и осаждением фрагментов клеток центрифугированием. Полученный осадок промывался (Wash Buffer type 6) и повторно центрифугировался с последующим разведением в 200 мкл Elution Buffer type 5. Растворы ДНК хранили при температуре -20°C.

2. Выделение ДНК из парафиновых блоков. Под контролем световой микроскопии, при помощи микротомы были выполнены срезы опухолевой ткани толщиной до 20 мкм. С целью депарафинизации образцов дважды проводилась инкубация срезов в ксилоле (1000 мкл) в течение 10" при температуре 65°C с последующим

центрифугированием. Далее производилась промывка образцов один раз в 96% этаноле (1000 мкл) в течении 1'. Тканевой лизис осуществлялся путем добавления 200 мкл лизирующего буфера: 1xTE (10 ммоль Tris-HCl (pH = 8.0)), 0.1 ммоль ЭДТА, также 2% натрия додецилсульфата и 5 мкл протеинкиназы K, с последующей инкубацией образцов при температуре 60°C в течении 8-16 часов до полного растворения ткани. Полученный лизат очищался путем добавления 200 мкл кислого трезола и 90 мкл смеси хлороформ-изоамилового спирта (с разведением 24:1), с последующим центрифугированием в течение 15' при температуре 0°C. Затем производился отбор надосадочной жидкости с добавлением 20 мкл 3М натрия ацетата (pH = 4.0), 1 мкл гликогена (20 мг/мл) и 310 мкл изопропанола с последующим осаждением лизата при температуре -20°C в течение 3 часов и центрифугированием в течении 20' при температуре ротора от 0 до 5°C. Полученный осадок промывали в 70% этаноле (500 мкл) в течении 3' с последующим центрифугированием в течении 5' при комнатной температуре, и растворяли в 10 мкл стерильной воды при температуре 65°C в течение 10'. ДНК хранили при температуре -20°C.

3. Идентификация мутаций. Методом аллель-специфической ПЦР производился поиск частых мутаций в генах *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* и *BLM* распространенных в славянской популяции (аллели *BRCA1* 5382insC, *BRCA1* 4153delA, *BRCA1* 185delAG, *BRCA2* 6174delT, *CHEK2* 1100delC, *CHEK2* IVS2+1G>A, *CHEK2* del5395, *BLM* 1642C>T). Состав реакционной смеси: 1 мкл ДНК, 1.0 ед. акт. ДНК-полимеразы, 1-кратный ПЦР буфер (pH = 8.3), 2.5 mM Mg⁺⁺, 200 мкМ dNTP, 0.3 мкМ прямого и обратного праймеров, SYBR green I в концентрации 0.2 x (исходный раствор 10000x; Molecular Probes). С целью накопления продуктов ПЦР проводилось 32 цикла амплификации: денатурация в течении 1' при температуре 95°C, отжиг в течении 1' при температуре 57°C, синтез в течении 35" при температуре 72°C. В исследовании применялись геномные праймеры, соответствующие мутациям и аллелям «дикого типа» [Соколенко А.П. и соавт. 2008]. ПЦР в режиме реального времени проводилась на оборудовании CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules). Учет результатов производился при помощи оценки графиков амплификации и кривых плавления.

Детекция мутаций *NBS1* 657del5 осуществлялась посредством высокоразрешающего плавления ПЦР-продукта (High Resolution Melting Analysis - HRMA). ПЦР-смесь включала: 1 мкл ДНК, 1.0 ед. акт. ДНК-полимеразы, 1-кратный ПЦР буфер (pH = 8.3), 2.5 mM Mg⁺⁺, 200 мкМ dNTP, 0.3 мкМ прямого и обратного праймеров, флюоресцентный краситель Eva Green. ПЦР и анализ кривых плавления проводился на приборе CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules). Условия реакции: 95°C 10 минут, 40 циклов 95°C 15", 60°C 20", 72°C 20". Интервал плавления - с 75°C до 95°C с шагом 0.1°C, время удерживания каждой температуры 20".

II. Получение и молекулярно-биологическая характеристика клеточных культур наследственного РМЖ, обусловленного мутациями в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*.

КЛ наследственных карцином МЖ были получены из образцов опухолей пациенток, не получавших НАХТ (n = 35). При подтверждении наследственного молекулярного дефекта в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*, производился забор опухолевой ткани МЖ в ходе операции на базе ЛООД или НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова. Фрагменты опухолей от носительниц мутаций использовались для создания КЛ. Всего за период с 2014 по 2016 гг. в лаборатории НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова были успешно перевиты в первичные культуры 30 образцов опухолей наследственного *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ. Для первичных экспериментов по определению химиочувствительности были отобраны 3 наиболее жизнеспособные мутантные КЛ, культивированные в течение многих пассажей (далее в тексте).

1. Перевивка опухолей в культуру клеток. Перевивка опухолей проводилась по стандартным методикам [Masters J.R.W., Palsson B., 1999; Kisselbach L. et al., 2009].

Хирургически удалённые образцы в стерильных условиях помещались в культуральную среду с антибиотиком и транспортировались в лабораторию. Потенциально жизнеспособные опухолевые очаги отделялись от некротических и неопухолевых тканей, измельчались и инкубировались. Для измельчения материала его помещали на чашку Петри и добавляли небольшое количество раствора Хэнкса (HBSS - Hank's Balanced Salt Solution). От полученного фрагмента максимально отделяли жировую ткань, оставляя только опухоль, которую переносили в новую чашку Петри с полной питательной средой DMEM, и измельчали скальпелем до фрагментов диаметром 1-2 мм. Далее опухоль инкубировали в присутствии коллагеназы (1.5 мг/мл, 12-16 часов). Полученную суспензию растворяли в 5 мл раствора трипсина + ЭДТА, добавляли холодный раствор Хэнкса (HBSS) с 2% телячьей эмбриональной сывороткой (FBS) и центрифугировали. Далее в образец добавляли 5 ед/мл диспазы и 1 мг/мл ДНКазы, ресуспендировали, добавляли холодный раствор Хэнкса и фильтровали через 40 мкм фильтр. При больших размерах опухоли (больше 1.5-2 см) измельченную опухолевую ткань диссоциировали механически, используя gentleMACS Dissociator, Miltenyi Biotec GmbH, с последующей ферментативной обработкой «Tumor Dissociation Kit» того же производителя. Диссоциированную суспензию фильтровали вторично через 40 мкм фильтр. Часть свежей ткани замораживали в жидком азоте.

Для обеспечения преимущественного роста эпителиальных клеток на первых пассажах клетки культивировали в среде с ростовыми факторами EpiCult-C Human Medium Kit, через 5-7 пассажей клетки переводили на полную питательную среду DMEM, содержащую 10% FBS, 2 mM/мл глутамин, 1% HEPES, пенициллин (100 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и комплекс аминокислот и витаминов, при $t +37^{\circ}\text{C}$, в атмосфере 5% CO_2 . Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста. Для длительного хранения клетки консервировали путем замораживания в жидком азоте на разных пассажах. Кроме того, для выделения эпителиальных клеток в некоторых культурах после 10-го пассажа был использован набор EasySep Human CD10 Positive Selection Kit (STEMCELL technologies), основанный на применении магнитных частиц.

2. Молекулярно-биологическая характеристика полученных клеточных культур. Характеристику молекулярно-биологических параметров КЛ проводили с помощью иммуноцитохимического скрининга следующих молекулярных маркеров:

- Мембранного рецептора эпидермального фактора роста (HER2) и ядерных рецепторов прогестерона и эстрогенов (PgR, ER), которые представляют собой стандартный набор маркеров для фенотипической характеристики молекулярных подтипов РМЖ.

- Трансмембранного гликопротеина CD44 - рецептора гиалуроновой кислоты, участвующего в процессе клеточного деления.

- Белков клеточной адгезии CD24 - небольших периферических белков клеточной мембраны, которые вовлечены в процессы адгезии и метастазирования.

- Белков субмембранного опорно-сократительного аппарата - цитокератинов СК5/6, СК14.

Для выполнения иммуноцитохимического анализа опухолевые клетки переносили на адгезионные стекла и культивировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . После культивирования и адгезии клеток на поверхность стекла замораживали, через 24 часа проводили фиксацию клеток и иммуноцитохимическое окрашивание с антителами (смотри ниже) с последующим окрашиванием вторичными антителами (к иммуноглобулинам мыши (AlexaFlour 488 nm) и кролика (AlexaFlour 568 nm)). Ядра окрашивали при помощи красителя Hoechst 33324. Срезы фиксировали при помощи Fluorescent Mount Solution и исследовали при помощи флуоресцентного микроскопа или клеточного анализатора.

Вышеуказанные молекулярные маркеры характеризуют биологические параметры опухолевых клеток. Они были изучены на трех наиболее стабильных культурах клеток:

CHEK2-позитивной (С22), *NBS1*-позитивной (N5) и *BLM*-позитивной (В3) линий клеток. Стабильность КЛ определялась, в первую очередь, сохранением их пролиферативной активности, а также высоким числом пассажей культуры. В качестве контроля была использована коммерческая *HER2*-позитивная КЛ «SK-BR-3».

3. Тестирование чувствительности КЛ к химиопрепаратам. Анализу химиочувствительности были подвергнуты две наиболее стабильно растущие КЛ: *CHEK2*-позитивная (С22) и *NBS1*-позитивная (N5). Определяли лекарственную чувствительность к следующим химиотерапевтическим препаратам: актиномицину, таксолу, цисплатину. Для оценки воздействия препарата использовали методику окрашивания клеток флуоресцеином изотиоцианатом аннексина V и пропидием йодидом (PI). Клетки, позитивные по аннексину, считались апоптозными, позитивные по обоим красителям - некротическими, негативные по обоим красителям - жизнеспособными [Chromik A.M. et al., 2010; Dong X. et al., 2009; Pabla N. et al., 2008; Xing A.Y. et al., 2013; Meerloo J. et al., 2011; Nahne J.C. et al., 2013]. Апоптоз индуцировали при помощи цитостатических препаратов в нецитотоксической концентрации: актиномицина - 100 нМ, таксола - 100 мкМ, цисплатина - 10 мкМ, с последующей инкубацией в течении 24 часов. В контрольных образцах опухолевых клеток уровень апоптоза оценивался вне воздействия химиотерапевтических препаратов при культивировании.

III. Изучение молекулярно-биологических и клинических параметров *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных опухолей МЖ.

В двух проанализированных когортах больных были идентифицированы 57 случаев носительства мутаций в генах *CHEK2* (n = 43), *NBS1* (n = 8) и *BLM* (n = 6), 44 из которых были детектированы в ходе проспективного скрининга, 13 - при анализе архивного материала. Данные еще 21 пациентки с наследственными мутациями были отобраны из имеющихся в распоряжении лаборатории молекулярной онкологии коллекций. В целом, экспериментальная группа из 78 случаев наследственного РМЖ включила 47 *CHEK2*-опосредованных, 12 *NBS1*-опосредованных и 19 *BLM*-опосредованных карцином. Контрольная группа для изучения клинико-биологических характеристик наследственного рака включила 107 пациенток со спорадическим РМЖ, проходивших обследование на базе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова за период 2014-2017 гг.

Для характеристики клинико-биологических параметров опухолей МЖ использовалась информация из текущей медицинской документации. Принимали во внимание клинические и морфологические особенности опухолей, включая: возраст манифестации рака, размеры опухоли, вовлеченность в патологический процесс регионарных лимфатических узлов, гистологический и молекулярный тип карцином.

Размеры опухоли, вовлеченность в патологический процесс регионарных лимфатических узлов и стадия заболевания оценивались в соответствии с классификацией TNM (Международный противораковый союз, 2003 г.). Характер экспрессии основных молекулярных маркеров РМЖ (ER, PgR, HER2) определялся по данным заключения иммуногистохимического исследования.

IV. Изучение химиочувствительности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-опосредованных опухолей МЖ.

Оценка лекарственной чувствительности в группе из 30 больных (21 - с мутациями в гене *CHEK2*, 6 - в гене *BLM* и 3 - в гене *NBS1*), получавших предоперационную ХТ, проводилась по имеющейся архивной медицинской документации. Контрольную группу составили пациентки, проходившие лечение по поводу спорадического РМЖ на базе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова за период 2011-2014 гг., и получавшие дооперационную лекарственную терапию (n = 105).

В ходе анализа оценивали чувствительность опухолей к стандартным комбинациям химиопрепаратов, применяемым для лечения РМЖ. Варианты схем ХТ, применявшихся для лечения пациенток с РМЖ, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Варианты используемых схем НАХТ.

Группа	Схема
Безтаксановые схемы	FAС (5-фторурацил + доксорубин + циклофосфамид)
	FEС (5-фторурацил + эпирубин + циклофосфамид)
Таксан-содержащие схемы	ТАС (доксорубин + циклофосфамид + доцетаксел)
	АТ (доксорубин + доцетаксел или доксорубин + паклитаксел)
	ТС (циклофосфамид + доцетаксел)
	Таксол (паклитаксел)
Другие схемы	СМF (циклофосфамид + метотрексат + 5-фторурацил)

Для простоты анализа все терапевтические схемы разделены на три большие категории в зависимости от групп химиопрепаратов, присутствующих в неoadъювантном режиме. В первую группу вошли режимы ХТ, содержащие только препараты антрациклинового ряда, без добавления препаратов таксанового ряда. Во вторую группу вошли режимы ХТ, содержащие препараты таксанового ряда с добавлением или без добавления препаратов антрациклинового ряда. В третью группу вошли все другие комбинации химиотерапевтических препаратов.

Эффективность неoadъювантного лечения оценивалась по достижению объективного клинического ответа. Оценка клинического ответа производилась по критериям RECIST 1.1 (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors). При этом определялся размер измеряемых таргетных очагов опухоли более 10 мм (более 15 мм для лимфатических узлов) с использованием стандартных методов инструментальной диагностики (маммография, УЗИ молочных желез) или более 20 мм при пальпации опухоли. Размеры измеряемых таргетных очагов опухолей измерялись до начала ХТ и по истечению 10 дней после последнего курса ХТ. Размер таргетного очага оценивался путем расчета суммы наибольших размеров очага - продольного и перпендикулярного ему размера (SPD).

Шкала RECIST 1.1:

1. Полный клинический ответ (ПКО): отсутствие таргетных очагов опухоли (или лимфатических узлов до 10 мм);
2. Частичный клинический ответ (ЧКО): снижение SPD в таргетных очагах более, чем на 30%;
3. Объективный ответ (ОО): включает в себя ПКО и ЧКО;
4. Прогрессирование заболевания (ПЗ): увеличение SPD в таргетных очагах более, чем на 20% с абсолютным увеличением более, чем на 5 мм или появление новых очагов;
5. Стабилизация заболевания (СЗ): любое состояние, не соответствующее всему выше описанному.

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась на основе специально созданных баз данных с помощью программы IBM SPSS Statistics, ver. 22. Были применены следующие статистические тесты: точный критерий Фишера (для сравнения малых выборок) и критерий Стьюдента; различия считались статистически

достоверными при значениях $p \leq 0.05$ [Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., 2002; Двойрин В.В., Клименков А.А., 1985].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты молекулярно-генетического скрининга среди пациенток с РМЖ

В ходе ДНК-анализа образцов крови и архивного материала были идентифицированы все включённые в тестирование мутантные аллели: *CHEK2* 1100delC, *CHEK2* ivs2+1G>A, *CHEK2* del5395, *NBS1* 657del5, *BLM* 1642C>T (Рисунки 2 - 4).

CHEK2 ivs2+1 G>A

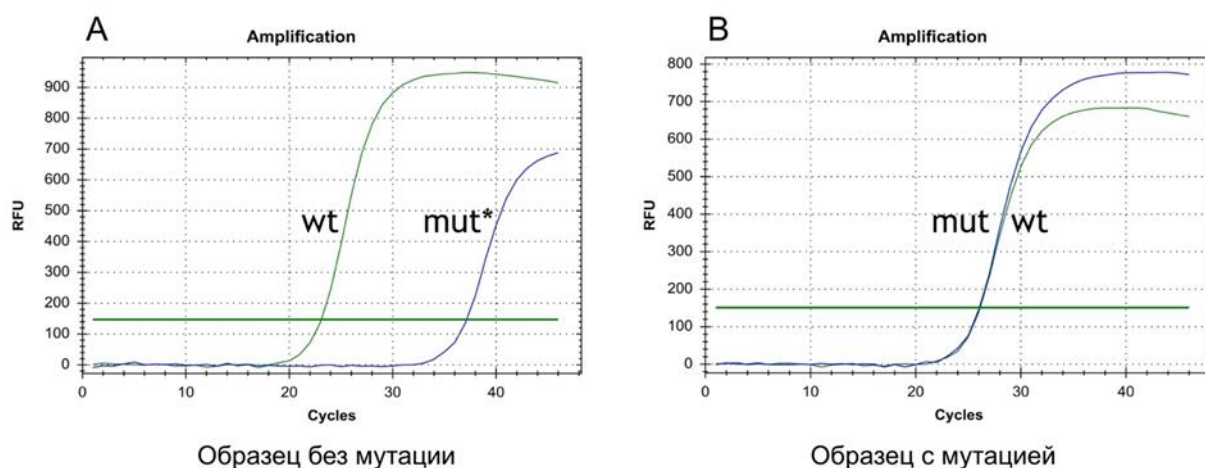


Рисунок 2. Детекция мутантного аллеля ivs2+1G>A гена *CHEK2* методом аллель-специфической ПЦР.

BLM Q548X

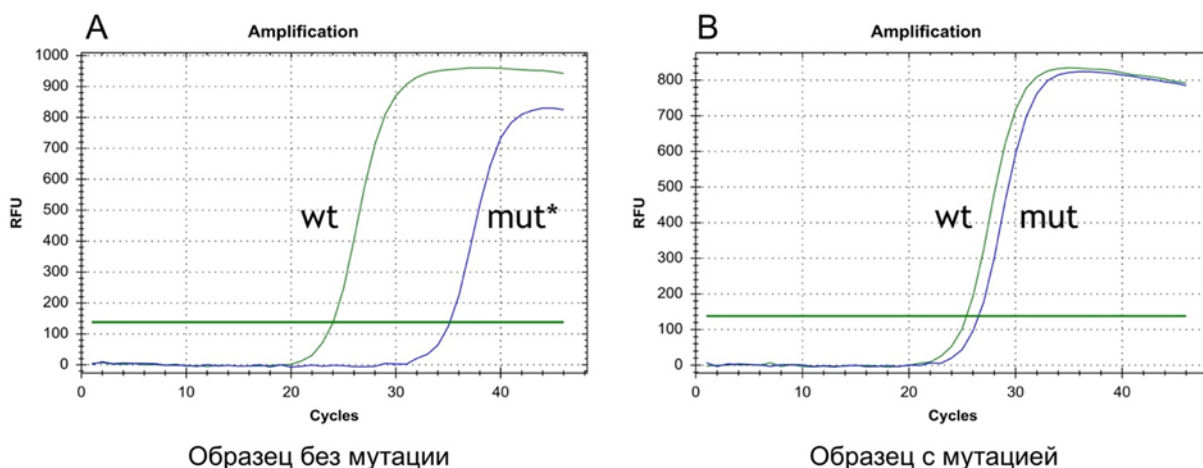


Рисунок 3. Детекция мутантного аллеля 1642C>T (Q548X) в гене *BLM* методом аллель-специфической ПЦР.

NBS1 657del5

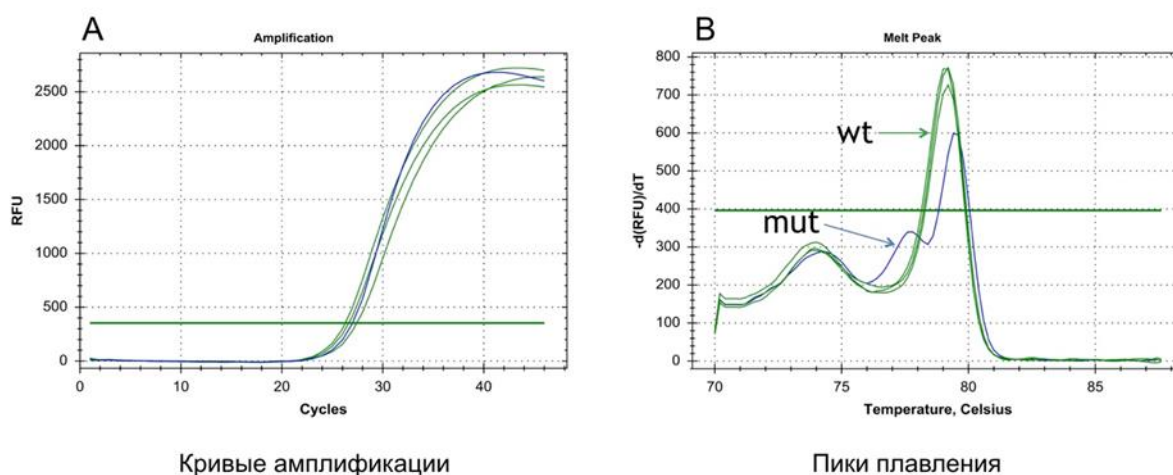


Рисунок 4. Детекция мутантного аллеля 657del5 в гене *NBS1* методами аллель-специфической ПЦР и высокого разрешающего плавления ПЦР-продукта.

Среди 220 доступных архивных образцов опухолевой ткани, полученных от пациенток с РМЖ, было обнаружено 13 случаев с часто встречающимися мутациями генов *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*. Из них, 9 пациенток являлись носительницами мутаций в гене *CHEK2*, 2 пациентки - в гене *NBS1* и еще 2 пациентки - в гене *BLM*. Из 1083 пациенток проспективной группы, в 44 образцах крови были также выявлены часто встречающиеся мутации в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*. Из них в 44 образцах крови были идентифицированы 34 мутантных аллеля гена *CHEK2*, 6 - гена *NBS1*, 4 - гена *BLM*. Из группы женщин-носительниц мутаций ($n = 21$), выявленных в ходе диагностической деятельности лаборатории молекулярной онкологии были выявлены 4 женщины-носительницы мутаций в гене *CHEK2*, 4 - в гене *NBS1* и 13 - в гене *BLM*.

Таким образом, при общем числе пациенток с РМЖ - 1324 (1083 + 220 + 21) в результате молекулярно-генетического скрининга было выявлено 78 носительниц мутаций, среди которых идентифицированы 47 мутаций в гене *CHEK2*, 12 - в гене *NBS1*, 19 - в гене *BLM*.

Молекулярно-биологическая характеристика клеточных линий наследственного рака молочной железы

35 образцов опухолей от 44 пациенток с РМЖ проспективной группы с идентифицированными мутациями в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* за период с 2014 по 2016 гг. были отобраны для создания КЛ наследственного рака. Образцы опухоли были получены во время оперативного лечения пациенток, не имевших неoadъювантной терапии в анамнезе. Из 35 образцов опухолей первично было получено 30 жизнеспособных клеточных культур, среди которых 22 линии были *CHEK2*-позитивными, 5 - *NBS1*-позитивными и 3 - *BLM*-позитивными. В таблице 2 представлены варианты мутантных аллелей соответствующих генов для КЛ, сохранивших пролиферативную активность, которая оценивалась по количеству пассажей для каждой культуры клеток.

Все линии клеток условно разбиты на 3 группы, в зависимости от поврежденного гена: группа «С» - для мутаций в гене *CHEK2*, группа «N» - для мутаций в гене *NBS1*, группа «В» - для мутаций в гене *BLM*. Большая часть из вновь создаваемых культур опухолевых клеток (20 КЛ) со временем утратила пролиферативную активность, что согласуется с данными о сложности длительного культивирования клеток из первичных опухолей молочной железы [Smith H.S. et al., 1984; Amadori D. et al., 1993;

Gazdar A.F. et al., 1998; Pandrangi S.L. et al., 2014]. Среди клеточных культур, не утративших пролиферативную активность, под наблюдением находилось 10 вариантов, включая: 5 *CHEK2*-позитивных, 3 *NBS1*-позитивных и 2 *BLM*-позитивных КЛ. Из них для изучения молекулярно-биологических характеристик опухолевых клеток были отобраны наиболее стабильно растущие на момент исследования КЛ, которые сохранили свою активность и находились на достаточно высоких сериях пассажей: C22 (*CHEK2*-позитивная), N5 (*NBS1*-позитивная) и B3 (*BLM*-позитивная).

Таблица 2. Пролиферативная активность полученных КЛ.

№	Название КЛ	Возраст пациентки	Мутантный аллель	Пассаж
1	B2	73	BLM Q548X	16
2	C15	54	CHEK2 1100delC	19
3	N3	54	NBS1 657del5	15
4	N4	32	NBS1 657del5	18
5	C19	70	CHEK2 5395del	12
6	C20	43	CHEK2 ivs1+2G>A	15
7	C21	54	CHEK2 ivs1+2G>A	6
8	N5	44	NBS1 657del5	32
9	C22	76	CHEK2 1100delC	21
10	B3	36	BLM Q548X	6

Изучение молекулярно-биологических характеристик опухолевых клеток выявило, что первичные КЛ по экспрессии основных молекулярных маркеров (HER2, ER, PgR, CD44, CD24, CK5/6, CK14) соответствуют фенотипу эпителиальных клеток МЖжелезы (Рисунки 5 и 6, таблица 3).

Таблица 3. Определение уровня экспрессии молекулярных маркеров в КЛ наследственного рака.

Клеточный маркер	SK-BR-3 (контроль)	N5 (30й пассаж)	C22 (21й пассаж)	B3 (5й пассаж)
HER2	3	1	2	0
PgR	1	1	1	1
ER	3	0	1	1
CD 44	3	3	3	2
CD 24	0	3	2	2
CK 5/6	0	3	2	1
CK 14	3	3	3	0

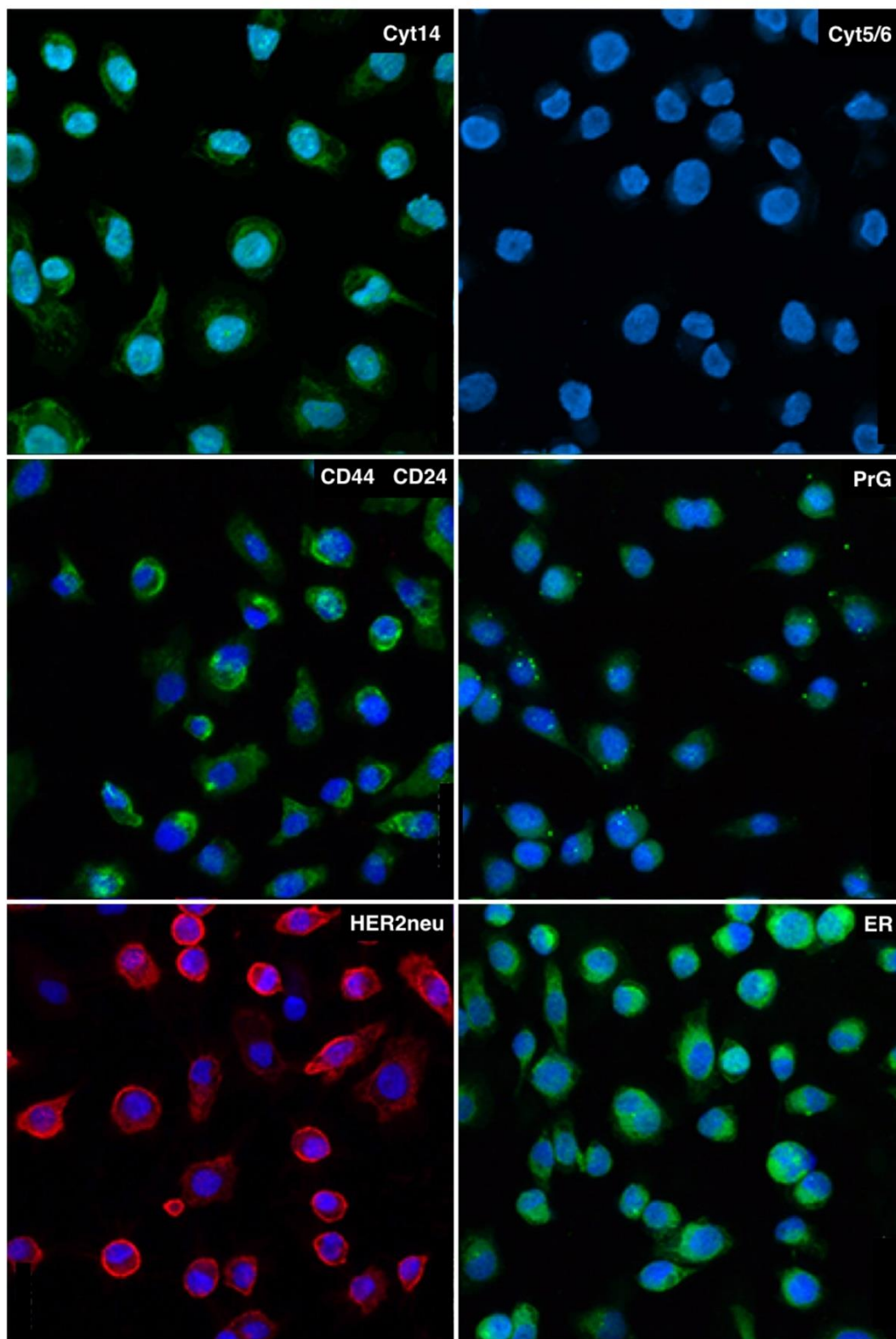


Рисунок 5. Иммуноцитохимический анализ контрольной (коммерческой) клеточной линии SK-BR-3 (HER2 3+, ER 3+, CD44/CD24 3+/0, CK 5/6 0, CK14 3+).

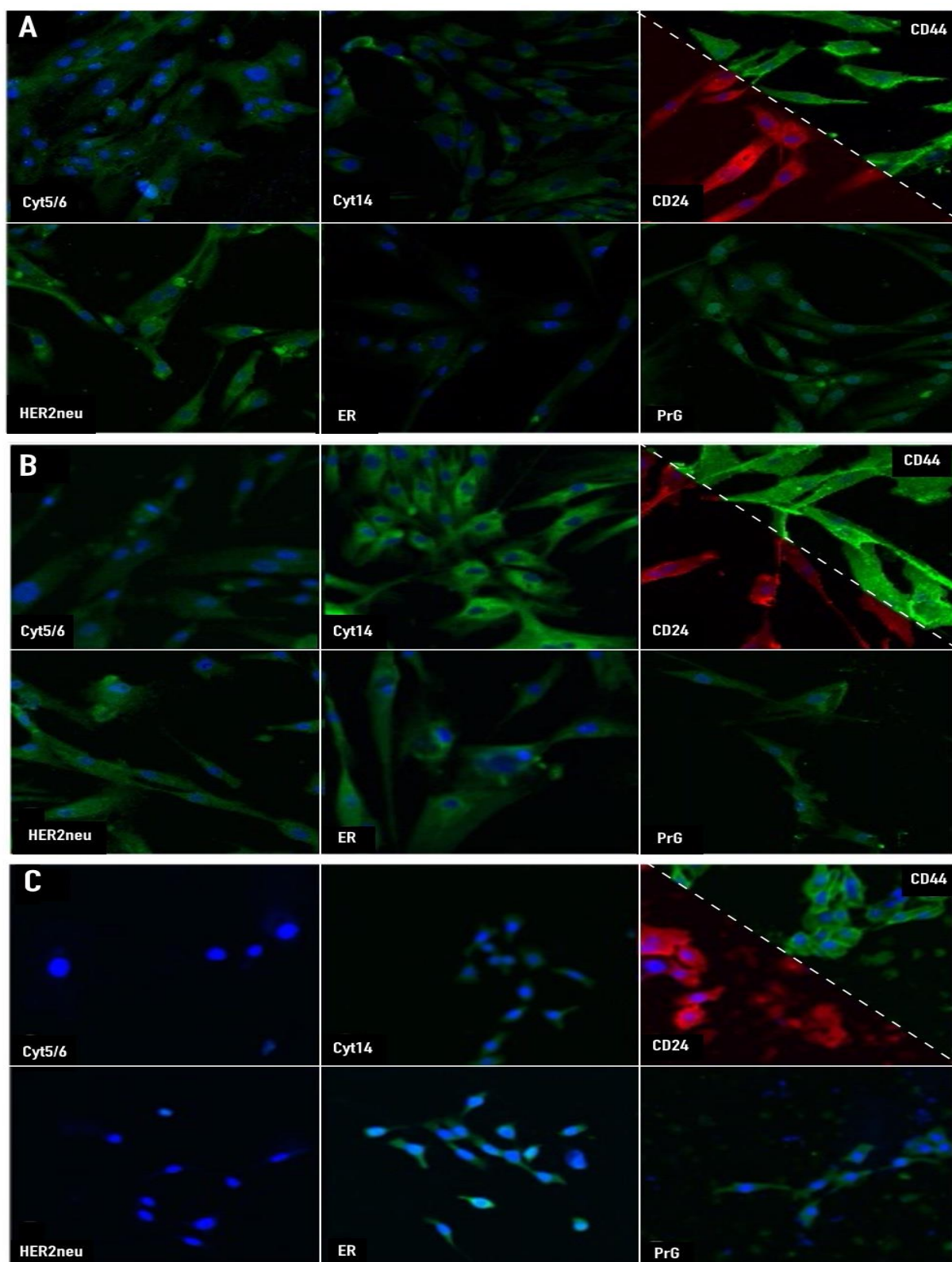


Рисунок 6. Иммуноцитохимический анализ экспериментальных КЛ. А - линия С22; Б - линия N5; В - линия В3.

КЛ С22 и N5, в отличие от линии В3, к моменту изучения химиочувствительности опухолевых клеток претерпели достаточно большое количество пассажей (21-й пассаж для КЛ С22, СНЕК2 1100delC+ и 32-й пассаж для КЛ N5, NBS1 657del5+), поэтому только они были использованы в экспериментах с химиопрепаратами. Лекарственная чувствительность КЛ оценивалась по интенсивности индукции апоптоза в опухолевых

клетках. Для линии С22 было отмечено в среднем двухкратное увеличение числа апоптотических клеток под воздействием химиопрепаратов (актиномицина, таксола, цисплатина). Так, число апоптотических клеток на стадии раннего апоптоза при культивировании с актиномицином составило 11.58%, с таксолом – 10.3%, с цисплатином – 10.75%, по сравнению с контрольными образцами, для которых значение составило 6.8%. Такие же данные были получены на стадии позднего апоптоза: при культивировании с актиномицином составило 35.83%, с таксолом – 41.73%, с цисплатином – 32.95%, по сравнению с контрольным образцом – 18.9% (Рисунок 7).

Для линии N5 значимого различия в числе апоптотических клеток до и после воздействия каждого препарата выявлено не выявлено. В контрольном образце число апоптотических клеток на стадиях раннего и позднего апоптоза составило 3.94% и 10.12% соответственно. А в экспериментальном образце, при культивировании клеток с актиномицином число клеток на стадии раннего апоптоза составило 4.46%, на стадии позднего апоптоза – 11.45%; при культивировании с таксолом – 5.1% и 13.91% соответственно; при культивировании с цисплатином – 4.42% и 14.19% соответственно (Рисунок 8).

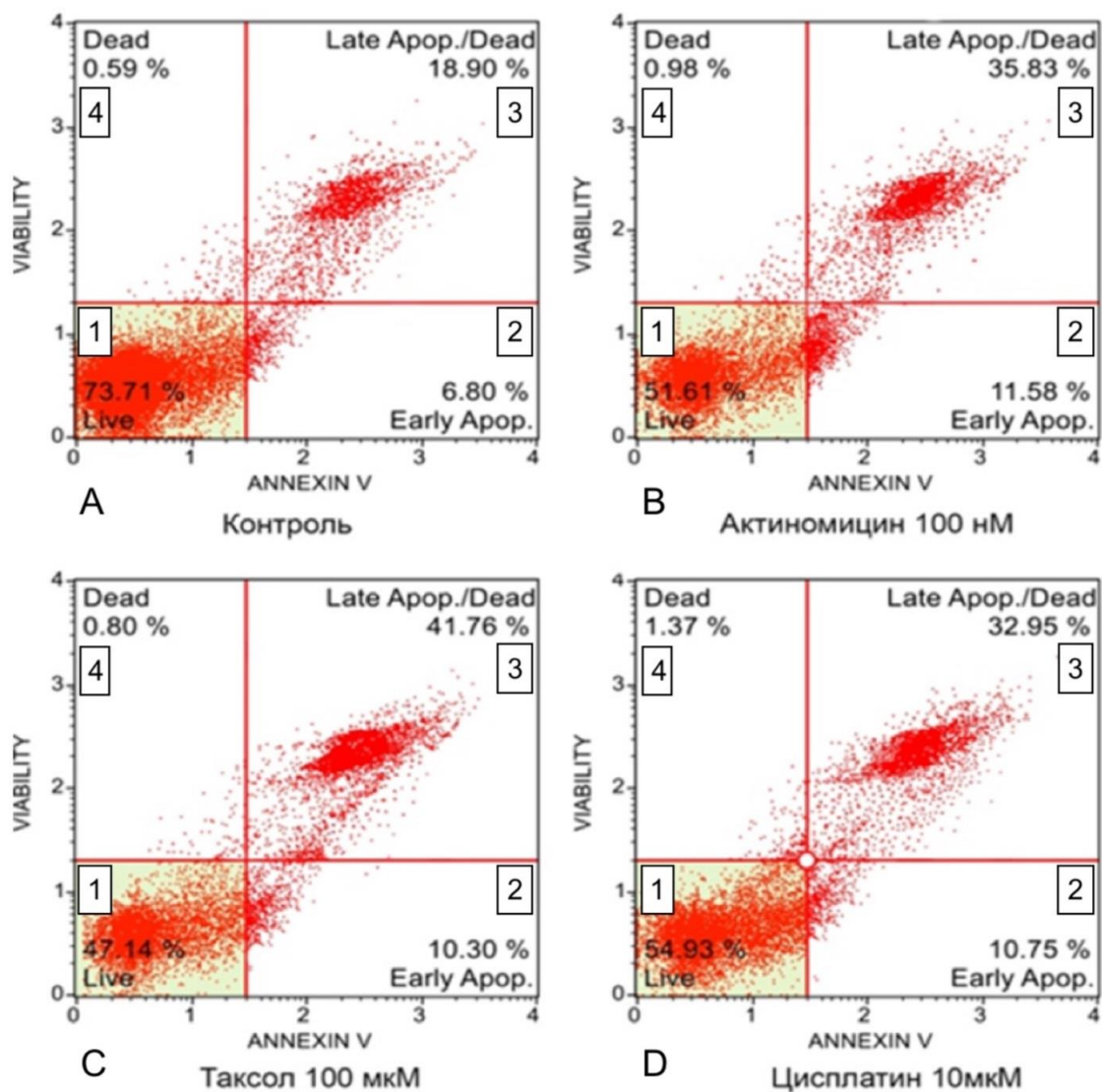


Рисунок 7. Оценка действия цитостатических препаратов на клеточную линию С22 методом проточной цитометрии.

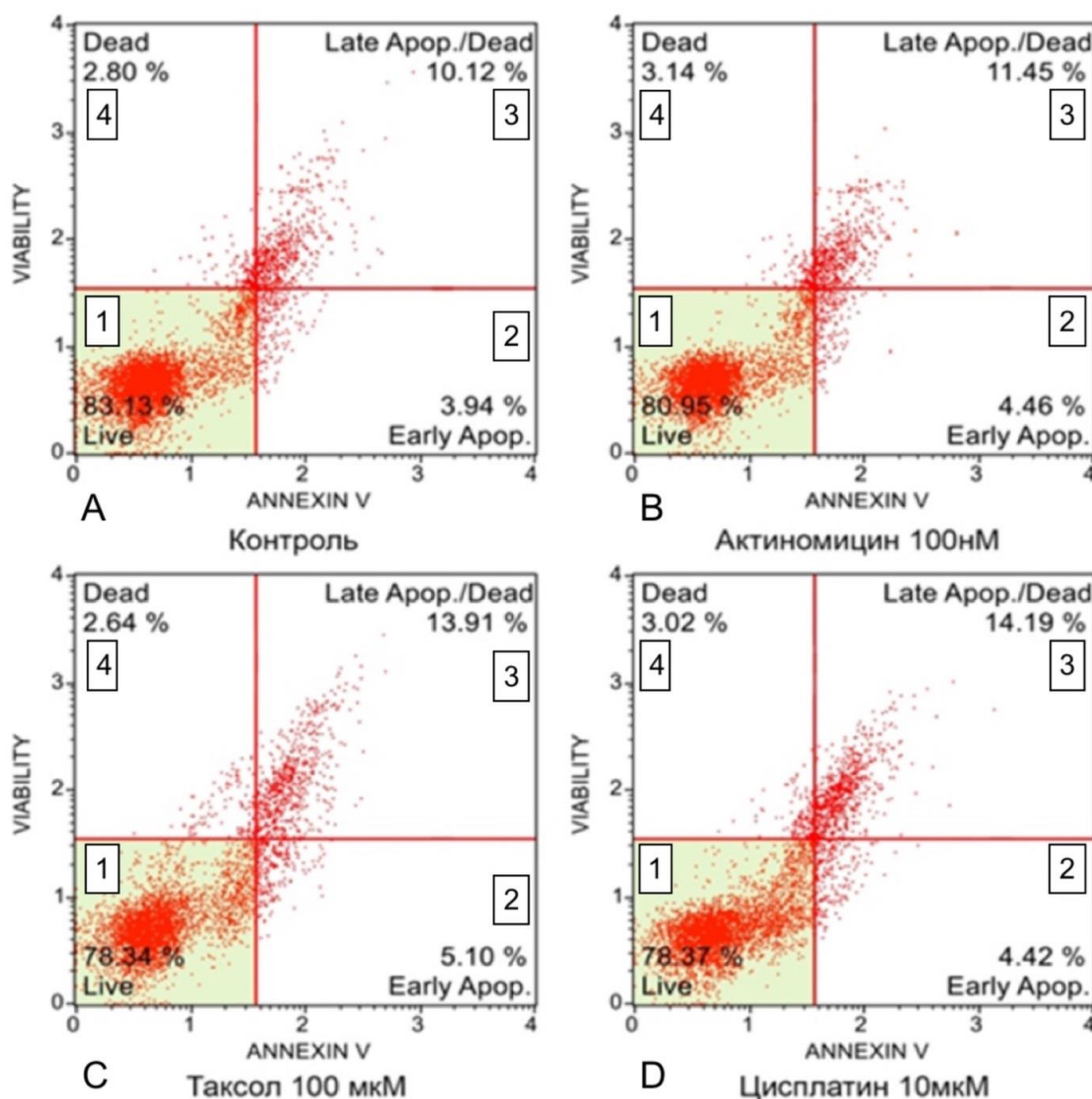


Рисунок 8. Оценка действия цитостатических препаратов на клеточную линию N5 методом проточной цитометрии.

Молекулярно-биологические и клинические особенности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных карцином молочной железы

Молекулярно-биологические и клинические особенности наследственного РМЖ были изучены среди 47 пациенток-носительниц мутаций в гене *CHEK2*, 12 - в гене *NBS1* и 19 - в гене *BLM*. Контрольная группа включала 107 пациенток со спорадическим РМЖ. Результаты сравнения молекулярно-биологических и клинических характеристик наследственных и спорадических опухолей МЖ представлены в таблице 4. К этим показателям относятся: возраст манифестации заболевания, размер и гистологический тип опухоли, вовлечение в патологический процесс регионарных лимфатических узлов, характер экспрессии мембранных и ядерных рецепторов опухолевых клеток.

Из таблицы 4 следует, что:

1. Средний возраст пациенток на момент манифестации заболевания оказался достоверно выше у носительниц мутаций в гене *CHEK2* (57.1 года), по сравнению со спорадическими опухолями (51.9 года) ($p = 0.02$, t-критерий Стьюдента), или женщинами-носительницами мутаций в генах *NBS1* (49.1 года) ($p = 0.12$, t-критерий Стьюдента) и *BLM* (49.4 года) ($p = 0.02$, t-критерий Стьюдента). Таким образом, *CHEK2*-опосредованные карциномы МЖ развиваются в более позднем возрасте, по сравнению с *NBS1*-, *BLM*-ассоциированными и спорадическими опухолями.

Таблица 4. Молекулярно-биологические и клинические характеристики *CHEK2*-, *NBS1*-, *BLM*-ассоциированных и спорадических карцином МЖ.

Параметр	Спорадический РМЖ*	CHEK2+ РМЖ	NBS+ РМЖ	BLM+ РМЖ
Число случаев	107	47	12	19
Возраст, лет: - средний - диапазон	51.9 25-84	57.1 32-86	49.1 28-68	49.4 36-77
Размер опухоли: T1 T2 T3 T4 н/д	40 (37.7%) 53 (50.0%) 7 (6.6%) 6 (5.7%) 1	7 (15.2%) 17 (37.0%) 8 (17.4%) 14 (30.4%) 1	4 (33.3%) 6 (50.0%) 2 (16.7%) 0 (0.0%) -	9 (52.9%) 5 (29.4%) 2 (11.8%) 1 (5.9%) 2
Поражение л/у: N0 N1-N3 н/д	50 (47.6%) 55 (52.4%) 2	15 (32.6%) 31 (67.4%) 1	4 (33.3%) 8 (66.7%) -	7 (41.2%) 10 (58.8%) 2
Экспрессия PgR: - позитивная - негативная - н/д	87 (83.7%) 17 (16.3%) 3	27 (60.0%) 18 (40.0%) 2	5 (45.5%) 6 (54.5%) 1	11 (68.8%) 5 (31.2%) 3
Экспрессия ER: - позитивная - негативная - н/д	93 (87.7%) 13 (12.3%) 1	40 (88.9%) 5 (11.1%) 2	9 (81.8%) 2 (18.2%) 1	12 (75.0%) 4 (25.0%) 3
Гиперэкспрессия HER2: - есть - нет - н/д	11 (10.4%) 95 (89.6%) 1	8 (18.6%) 35 (83.3%) 4	1 (11.1%) 8 (88.9%) 3	2 (12.5%) 14 (87.5%) 3
Трижды-негативный фенотип: - нет - есть - н/д	98 (91.6%) 9 (8.4%) -	43 (95.6%) 2 (4.4%) 2	8 (88.9%) 1 (11.1%) 3	13 (81.2%) 3 (18.8%) 3
Гистологический тип: - NST** - дольковый - другой*** - н/д	91 (86.7%) 7 (6.7%) 7 (6.7%) 2	39 (86.7%) 2 (4.4%) 4 (8.9%) 2	11 (100%) 0 (0.0%) 0 (0.0%) 1	16 (100%) 0 (0.0%) 0 (0.0%) 3

2. У пациенток с мутациями в гене *CHEK2* реже встречались опухоли размером до 2 см в диаметре (T1) (*CHEK2* – 7/46, 15.2%), чем у пациенток без носительства мутаций (спорадические случаи рака – 40/106, 37.7%) ($p = 0.007$, точный тест Фишера) и чаще встречались опухоли с распространением на грудную стенку или кожу (T4) (*CHEK2* – 14/46, 30.4%), чем при спорадическом раке (6/106, 5.7%) ($p < 0.001$, точный тест Фишера).

3. Вовлечение в патологический процесс регионарных лимфатических узлов наблюдалась чаще в группе *CHEK2*-позитивных опухолей (31/46, 67.4%) по сравнению со спорадическими формами РМЖ (55/105, 52.4%), хотя различия с контрольной группой оказались статистически недостоверными ($p = 0.1$, точный тест Фишера).

4. Среди всех изучаемых наследственных форм РМЖ преобладали ER-позитивные карциномы (*CHEK2* - 40/45, 88.9%; *NBS1* – 9/11, 81.8%; *BLM* – 12/16, 75.0%), как и при случаях спорадического РМЖ (93/106, 87.7%).

Частота позитивной экспрессии рецепторов прогестерона среди наследственных форм РМЖ оказалась ниже (*CHEK2* – 27/45, 60.0%; *NBS1* – 5/11, 45.5%; *BLM* – 11/16, 68.8%), чем при спорадических формах рака (87/104, 83.7%) ($p = 0.003$, $p = 0.008$ и $p = 0.17$ соответственно, точный тест Фишера).

Частота «трижды-негативного» РМЖ (HER2-, ER-, PgR-) в группах *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-опосредованного рака была невысокой и составляла 2/45 (4.4%), 1/9 (11.1%) и 3/16 (18.8%) соответственно, и достоверно не отличалась от таковой в группе пациенток со спорадическим РМЖ (9/107, 8.4%).

Проведенный анализ свидетельствует о наличии определённых клинико-биологических особенностей *CHEK2*-опосредованного рака, к которым можно отнести более поздний возраст развития заболевания; повышенную долю распространенных опухолей (T4); высокую частоту экспрессии рецепторов эстрогенов и меньшую частоту позитивной экспрессии рецепторов прогестерона, по сравнению с ненаследственным РМЖ.

Полученные результаты, в основном, согласуются с опубликованными наблюдениями о *CHEK2*-ассоциированных опухолях. Показано, что для них характерны положительный экспрессионный ER-статус [Cybulski C. et al., 2009; Schmidt M.K. et al., 2016], повышенный риск контралатеральных карцином молочной железы [Kilpivaara O. et al., 2005; Schmidt M.K. et al., 2007; Fletcher O. et al., 2009; Weischer M. et al., 2012], и более низкие, по сравнению со спорадическими опухолями, показатели продолжительности жизни [Bock G.H. et al., 2004; Schmidt M.K. et al., 2007; Zhang S. et al., 2008; Nagel J.H. et al., 2012; Weischer M. et al., 2012].

NBS1- и *BLM*-зависимые опухоли существенно не отличаются от спорадических карцином по большинству анализируемых параметров, за исключением статуса экспрессии рецептора прогестерона: при этих типах наследственного РМЖ, как и при *CHEK2*-ассоциированных карциномах, чаще наблюдалось отсутствие экспрессии PgR.

NBS1-ассоциированные карциномы МЖ являются чаще ER-позитивными, что хорошо согласуется с данными литературы по исследованию молекулярно-биологических характеристик данной категории опухолей. [Bartkova J. Et al., 2008].

Анализ химиочувствительности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных карцином МЖ у пациенток с известным результатом неоадьювантного лечения

Получены данные о результатах неоадьювантного лечения 30 случаев РМЖ с наследственными мутациями в генах *CHEK2* (21 пациентки), *BLM* (6 пациенток) и *NBS1* (3 пациентки). Контрольная группа включала 105 пациенток со спорадическим РМЖ, получавших НАХТ. Варианты схем ХТ и клинического ответа среди пациенток с наследственным РМЖ представлены в таблицах 5 - 7.

Большинство пациенток в контрольной ($n = 105$) и экспериментальной ($n = 30$) группах получали терапию таксан-содержащими схемами ХТ (101/135; 74.8%), антрациклиновые схемы ХТ были назначены 25 пациенткам (18.5%), другие варианты лечения получали 9 женщин (6.7%).

Доля пациенток в контрольной и экспериментальной группах, продемонстрировавших ОО на проводимое противоопухолевое лечение при использовании стандартных схем ХТ, указаны в таблице 8. В контрольной группе ($n = 105$) 18 человек получали лечение препаратами антрациклинов (без добавления препаратов таксанового ряда). Среди них доля объективного ответа ОО составила: ЧКО 15/18 (83.3%). У двоих женщин отмечалась СЗ и еще у одной – ПЗ. 80 человек из контрольной группы получали препараты таксанового ряда (с/без добавления антрациклинов). Среди них доля ОО составила 72/80 (90.0%). Среди ОО: ПКО ($n = 12$),

ЧКО (n = 60). Еще у 8 женщин отмечалась СЗ. 7-ми пациенткам были назначены другие схемы ХТ или гормонотерапия; их параметры не представлены в таблице 8. Частота ПКО в контрольной группе спорадического РМЖ составила 12/105 (11.4%) случаев.

Таблица 5. Параметры *CHEK2*-ассоциированного РМЖ у пациенток, получавших НАХТ.

№	Мутация	Возраст	TNM	Статус рецепторов	Режим ХТ	Ответ
1	CHEK2 1100delC	39	T3N1M0	ER+/PgR+/HER2-	АТ (5)	ЧКО
2	CHEK2 1100delC	40	T2N2Mx	н/д	CMF (3) + RT, FDC (2)	ПЗ
3	CHEK2 1100delC	62	T4bN3M0	ER+/PgR+/HER2-	АТ (5)	СЗ
4	CHEK2 1100delC	43	T4bN1M0	ER+/PgR+/HER2+	Таксол + Герцептин (6)	ЧКО
5	CHEK2 ivs2+1G>A	52	T4N0M0	ER-/PgR-/HER2+	Таксол + Герцептин (4), FEC + Герцептин (3)	ПКО
6	CHEK2 ivs2+1G>A	61	T2N2M0	ER+/PgR+/HER2+	Таксол + Герцептин (4), FEC + Герцептин (3)	ЧКО
7	CHEK2 ivs2+1G>A	35	T3N1M0	ER+/PgR+/HER2	FEC (3)	ЧКО
8	CHEK2 ivs2+1G>A	55	T4bN2M0	ER+/PgR+/HER2+	ТС (4), ТС + Герцептин (2)	ЧКО
9	CHEK2 ivs2+1G>A	49	T4N1M0	ER+/PgR+/HER2-	Таксол (2), ТАС (4)	ЧКО
10	CHEK2 del5395	56	T4N2M0	ER+/PgR-/HER2+	Таксол + Герцептин (4), FEC + Герцептин (4)	ЧКО
11	CHEK2 del5395	32	T3N0M0	ER+/PgR+/HER2	FDC (2), Таксол (4)	ЧКО
12	CHEK2 del5395	45	T3N1M0	н/д	CAF (4)	ЧКО
13	CHEK2 del5395	72	T4N2Mx	ER-/PgR-/HER2-	ТС (4)	ЧКО
14	CHEK2 del5395	54	T4N1M0	ER-/PgR-/HER2+	ТАС (6), Герцептин (7)	ЧКО
15	CHEK2 del5395	50	T4bN3/2M0	ER+/PgR+/HER2-	FAC (8)	ЧКО
16	CHEK2 del5395	49	T4bN0M0	ER+/PgR+/HER2+	АТ (6)	ЧКО
17	CHEK2 del5395	56	T4bN2M0	ER+/PgR+/HER2+	Гормон-терапия	ЧКО
18	CHEK2 del5395	64	T2N2M0	ER+/PgR+/HER2+	FDC (5)	СЗ
19	CHEK2 del5395	51	T2N1M0	ER+/PgR+/HER2+	ТС (2)	ЧКО
20	CHEK2 del5395	31	T2N2M0	ER+/PgR+/HER2+	ТАС (4)	ЧКО

Эффективность НАХТ *CHEK2*-опосредованных опухолей была оценена у 20 пациенток (Таблица 5). Из них одна больная получала гормонотерапию (не вошла в таблицу 8), 5 пациенток - лечение антрациклин-содержащими схемами без таксанов, и 14 пациенток - таксан-содержащую ХТ (n = 19). ОО на лечение был зафиксирован у 16 женщин (84.2%) (p = 0.68, *CHEK2*-опосредованные опухоли в сравнении со спорадическими опухолями, точный тест Фишера). При этом, доля ОО была выше в группе пациенток, получавших терапию таксанами (13/14; 92.9%), чем среди больных с

лечением антрациклинами без применения таксанов (3/5; 60%) ($p = 0.154$, точный тест Фишера). ПКО наблюдался у одной пациентки с HER2-экспрессирующей опухолью МЖ, получавшей антрациклины, таксаны и герцептин. Меньшая чувствительность к антрациклин-содержащим вариантам ХТ подтверждается другими исследованиями, касающимися химиочувствительности данной категории наследственного рака [Chrisanthar et al., 2008].

Таблица 6. Параметры *BLM*-ассоциированного РМЖ у пациенток, получавших НАХТ.

№	Мутация	Возраст	TNM	Статус рецепторов	Режим ХТ	Ответ
1	BLM Q548X	58	T2N2M0	ER+/PgR+/HER2-	FAС	ПКО
2	BLM Q548X	52	T3N0M1	н/д	ТАС (5)	ЧКО
3	BLM Q548X	48	T1N1M0	ER-/PgR-/HER2-	АТ (6)	ЧКО
4	BLM Q548X	52	T1N0M0	ER+/PgR+/HER2-	АТ (6)	ЧКО
5	BLM Q548X	41	T1N1M0	ER-/PgR-/HER2-	ТАС (4) + RT	ЧКО
6	BLM Q548X	41	T3N2M0	н/д	ТАС	ЧКО
7	BLM Q548X, CHEK2 5395del5	56	T4bN1M0	ER-/PgR-/HER2+	Таксол + FEC + Герцептин (8)	ЧКО

В группе пациенток-носительниц мутаций в гене *BLM* ($n = 6$), получавших лечение препаратами из групп антрациклинов и таксанов, ОО наблюдался во всех 6 случаях (Таблица 6). ПКО при этом наблюдался только в одном из шести случаев (16.7%).

Таблица 7. Параметры *NBS1*-ассоциированного РМЖ у пациенток, получавших НАХТ.

№	Мутация	Возраст	TNM	Статус рецепторов	Режим ХТ	Ответ
1	NBS1 657del5	35	T3N3M0	ER+/PgR+/HER2-	ТС (2), ТАС (4)	ПЗ
2	NBS1 657del5	49	T3N1M0	ER-/PgR-/HER2+	ТС + Герцептин (4)	ЧКО
3	NBS1 657del5	43	T2N0M0	н/д	FDC	ЧКО

У двух пациенток из группы носительниц мутаций в гене *NBS1* был зафиксирован ЧКО. Одна пациентка получала препараты из группы таксанов и герцептин, а вторая находилась на лечении антрациклинами. У третьей пациентки с таксан-содержащими схемами ХТ отмечалось ПЗ (Таблица 7).

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что *BLM*-ассоциированные опухоли МЖ отвечают на лечение стандартными схемами ХТ лучше, чем *CHEK2*- и *NBS1*-ассоциированные формы рака. Малая выборка ($n = 3$) *NBS1*-позитивных карцином МЖ с известным результатом терапии не позволяет пока сделать каких-либо выводов об особенностях ответа на лечение у данной категории наследственного рака. В одном из трёх проанализированных выше случаев *NBS1*-ассоциированных карцином наблюдалось ПЗ, что может указывать на сниженную эффективность проводимой ХТ у носительниц дефектов гена *NBS1*, в сравнении со спорадическими формами РМЖ.

Таблица 8. Частота ОО в контрольной и экспериментальных группах.

Исследуемые группы	Таксан-содержащие схемы (с/без антрациклинов)	Антрациклин-содержащие схемы (без применения таксанов)	Значения <i>p</i> (таксан-содержащие схемы в сравнении с антрациклиновыми схемами)
Контроль (n = 98) Доля ОО	n = 80 72 (90%)	n = 18 15 (83.3%)	p = 0.418
CHEK2+ опухоли (n = 19) Доля ОО	n = 14 13 (92.9%)	n = 5 3 (60%)	p = 0.154
NBS1+ опухоли (n = 3) Доля ОО	n = 2 1	n = 1 1	-
BLM+ опухоли (n = 6) Доля ОО	n = 5 5	n = 1 1	-

Кроме того, ответ на лечение был оценен еще у одной пациентки, которая оказалась гетерозиготной сразу по двум мутациям (BLM Q548X и CHEK2 del5395). Ответ на лечение у нее был приближен к ПКО, о чем свидетельствует полное исчезновение первичной опухоли (сT4bN1M0-pT0N1M0). Данный случай не был включен в отчет по характеристике лекарственной чувствительности групп CHEK2- и BLM-ассоциированного РМЖ.

Выводы

1. Охарактеризованы молекулярно-биологические параметры CHEK2, NBS1 и BLM-опосредованных опухолей и спорадического рака. Для них показано преобладание позитивного статуса экспрессии рецепторов эстрогенов и низкая частота «трижды-негативного» молекулярного фенотипа. Доля опухолей, негативных в отношении рецепторов прогестерона, существенно выше среди CHEK2-ассоциированных (18/45, 40%) и NBS1-ассоциированных (6/11, 54.5%) новообразований по сравнению со спорадическими карциномами МЖ (17/104, 16.3%) (p = 0.003 и p = 0.008, соответственно, точный тест Фишера).

2. Охарактеризованы клинико-биологические особенности CHEK2-опосредованных карцином. Показано, что они по сравнению со спорадическим РМЖ имеют: более поздний возраст начала заболевания (57.1 года против 51.9 года, соответственно) (p = 0.02, t-критерий Стьюдента) и повышенную частоту распространения опухолей на грудную стенку и кожу (Т4) (14/46, 30.4% против 6/106, 6.7% соответственно) (p < 0.001, точный тест Фишера).

3. Показано, что у пациенток-носительниц мутаций в гене CHEK2 неoadъювантная терапия таксан-содержащими схемами сопровождается большей частотой объективного ответа (13/14, 92.9%), чем использование схем, содержащих только антрациклины (3/5, 60%) (p = 0.154, точный тест Фишера).

4. При BLM-ассоциированном РМЖ (n = 6) объективный ответ на неoadъювантную терапию (ЧКО - у 5, и ПКО - у 1 пациентки) был достигнут во всех наблюдаемых случаях, что может свидетельствовать о высокой чувствительности данной категории наследственного РМЖ к стандартным схемам химиотерапии.

Практические рекомендации

1. При планировании проведения химиотерапевтического лечения в неоадьювантном режиме среди пациенток с РМЖ, вне зависимости от молекулярно-биологического подтипа рака, целесообразно проводить генетическое тестирование для выявления носительства онкоассоциированных мутаций в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* с целью подбора персонализированных подходов к терапии у пациенток с данными вариантами наследственного РМЖ.

2. При планировании неоадьювантной химиотерапии у пациенток с *CHEK2*-ассоциированными карциномами МЖ предпочтение стоит отдавать схемам, содержащим препараты из группы таксанов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Pfeifer W., Sokolenko A.P., Potapova O.N., Bessonov A.A., Ivantsov A.O., Laptiev S.A., Zaitseva O.A., Yatsuk O.S., Matsko D.E., Semiglazova T.Yu., Togo A.V., Imyanitov E.N. Breast cancer sensitivity to neoadjuvant therapy in BRCA1 and CHEK2 mutation carriers and non-carriers // *Breast Cancer Research and Treatment*. - 2014. - Vol. 148(3). - P. 675-683.

2. Laptiev S.A. Breast cancer sensitivity to neoadjuvant therapy in CHEK2 mutation carriers and non-carriers // II Conference to the International Day of DNA «Modern Biotechnologies for Science and Practice». - St. Petersburg. - 2015. - P. 7-8.

3. Preobrazhenskaya E.V., Bizin I.V., Kuligina E.Sh., Shleykina A.Yu., Suspitsin E.N., Zaytseva O.A., Anisimova E.I., Laptiev S.A., Gorodnova T.V., Belyaev E.V., Imyanitov E.N., Sokolenko A.P. Detection of BRCA1 rearrangements by droplet digital PCR // *Breast Cancer Research and Treatment*. - 2017. - Vol. 165(3). - P. 765-770.

4. Лаптиев С.А., Корженевская М.А., Имянитов Е.Н. Молекулярный фенотип CHEK2-ассоциированных карцином молочной железы. III Всероссийская 14 Межрегиональная с международным участием научная сессия молодых ученых и студентов «Современные решения актуальных научных проблем медицины». - Нижний Новгород. - 2017. - С. 94-95.

5. Лаптиев С.А., Корженевская М.А., Имянитов Е.Н. Молекулярно-генетический портрет рака молочной железы // *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. - 2017. - №24 (2). - С. 12-22.

6. Лаптиев С.А., Корженевская М.А., Соколенко А.П., Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н. Медико-генетическое консультирование при наследственных формах рака молочной железы и рака яичников // *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. - 2018. - №25 (2). - С. 7-18.

7. Лаптиев С.А., Корженевская М.А., Соколенко А.П., Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н. Особенности новых наследственных форм рака молочной железы у Российских пациенток. Международный конгресс «VII съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы». - Санкт-Петербург. - 2019. - С. 749.

Выражаю глубокую благодарность научным руководителям исследовательской работы - член-корреспонденту РАН, доктору медицинских наук, профессору Евгению Наумовичу Имянитову и кандидату биологических наук Марине Анатольевне Корженевской за уделённое внимание и содействие при выполнении работы. Благодарю старшего научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» кандидата медицинских наук Аглаю Геннадиевну Иевлеву за редакторские замечания в работе, старшего научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» кандидата медицинских наук Анну Петровну Соколенко за помощь в подготовке материала исследования, научного сотрудника научной лаборатории молекулярной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Ольгу Станиславовну Яцук за помощь в обучении методам исследования. Выражаю признательность коллективу научной лаборатории молекулярной онкологии за доброжелательное отношение и помощь в работе.