

*Anton A. Nalyotov,
Doctor;*

*Akhat Kh. Sabirov,
MD, Professor;
Tyumen State Medical Academy*

Molecular Biological Characteristics of Patients with Hereditarily- Induced Breast Cancer in the Tyumen Region

Key words: *individualization, modernization, BRCA1/2 u CHEK-2 gene.*

Annotation: *The paper presents the results of the analysis of molecular biological indicators most frequent mutations in the BRCA1 / 2 and CHEK-2. Revealed the presence of overexpression of molecular - genetic markers (ER, RP; Her 2-neu), typical for the residents of the Tyumen region. A program of individual clinical supervision for each patient.*

Актуальность проблемы: Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей онкологической патологией у женщин старше 40 лет. Это самая распространенная форма злокачественной опухоли в структуре онкологической заболеваемости и смертности у женщин. Ежегодно РМЖ диагностируют более чем у 1 млн. женщин во всем мире. Семейную историю накопления случаев РМЖ и опухолей женской репродуктивной системы отмечают 25% заболевших женщин; в 10% случаев этиологическим фактором являются структурные и функциональные перестройки высокопенетрантных генов BRCA1, BRCA2 и CHEK-2. Одним из современных подходов к ранней диагностике и профилактике РМЖ являются медико-генетическое консультирование. В Тюменской области в 2012 году в структуре злокачественных заболеваний опухолей молочной железы находились на втором месте (11,4%), уступая лишь опухолям трахеи, бронхов, легкого (15,06%). По распространенности в женской популяции первое место уверенно за опухолями молочной железы (20,3%). При этом, заболеваемость по сравнению с 2004 годом выросла на 5,21% (с 46,65% до 51,86% соответственно). Удельный вес больных с 1-2 стадиями процесса остался на прежнем уровне (67,19% в 2004г, против 67,99% - в 2010г). Также на прежнем уровне осталась смертность от РМЖ (20,98% - в 2004г., против 20,06 в 2010г.).

К настоящему моменту сообщается более чем о ста факторах прогноза, дающих представление о биологическом поведении опухоли. Для предсказания клинического течения опухолевого процесса, ответа на лечение и исхода РМЖ большое значение придается маркерам, определяемыми иммуногистохимическими и молекулярно-генетическими методами.

Цель работы: Определение молекулярно-генетических маркеров опухоли у пациенток с BRCA - позитивным раком молочной железы в Тюменской области.

Материалы и методы: При выполнении настоящего исследования в обследуемую группу были включены 50 пациенток маммологического отделения Тюменского областного онкологического диспансера, с семейным анамнезом. Иммуногистохимическое определение РЭ, РП, онкобелка HER-2, антигена Ki-67

проводилось в лаборатории морфологических исследований патанатомического отделения Тюменского ООД. Молекулярно-генетические исследования проводились в ООО «Центр молекулярно-генетической диагностики Сабирова А.Х.»

Молекулярно-генетические исследования проводились после выделения ДНК методом последовательной фенольно-хлороформной экстракции по Мэтью из цельной венозной крови (Mathew С.С. et al., 1984). Далее проводилось изучение молекулярно-генетического (мутационного статуса) по парафинированным образцам опухолевой ткани и по плазме крови при помощи аллель специфической ПЦР в режиме реального времени. При этом результаты исследования выводятся на монитор специального автоматического учитывающего устройства в виде секвенограмм. Для определения нуклеотидных замен проводили электрофорез амплифицированных фрагментов соответствующей эндонуклеазной рестрикции.

Следующим этапом исследования стало изучение происходящих молекулярно-генетических изменений, происходящих при наследственно-обусловленных РМЖ. Изучалась выраженность этих нарушений в зависимости от гистологического варианта опухоли, рецепторного статуса, пролиферативной активности.

При изучении операционного и биопсийного материала большее количество мутаций наблюдается у больных с низкодифференцированными опухолями. При этом наиболее часто встречаются мутации генов p 53 в 7 экзоне, k-ras, B-raf, E-кадхерин (табл. 1 - 3).

Таблица 1.

Распределение больных с выявленными мутациями различных генов в зависимости от степени дифференцировки опухоли в парафинированных образцах (n=50).

	ДНК	ВД ¹ (n=6)	УД ² (n=16)	НД ³ (n=28)	Кол-во мутаций	
Парафиновые образцы	p53	5 экзон	3	3	9	15
		6 экзон	2	4	22	28
		7 экзон	4	9	36	49
		8 экзон	3	5	12	20
	C-kit	12 кодон	0	1	9	10
	B-raf	15 кодон	1	4	5	10
	APC		2	3	6	11
	K-ras	12,13 кодоны	0	6	19	25
	E-кадх.	гиперметилирование	4	7	12	23
	p16	гиперметилирование	0	4	11	15
Итого		19	46	141	206	

1 – высокодифференцированный РМЖ; 2 – умереннодифференцированный РМЖ; 3 – низкодифференцированный РМЖ

Из таблицы видно, что наибольшее количество мутаций выявлено у больных РМЖ с низкой степенью дифференцировки опухоли (141 мутация). При этом преобладают мутации генов p 53 в 7 эк (36 случаев у больных с

низкодифференцированным РМЖ) и Е-кадхерин (12 случаев у больных с низкодифференцированным РМЖ). Индекс пролиферативной активности Ki-67 большее значение (>50%) имел также у больных с низкодифференцированными формами РМЖ (32 случаев). Высокий уровень Ki-67 также часто встречается у больных с низкой дифференцировкой опухоли, что является свидетельством агрессивности опухолевых клеток, что не противоречит литературным данным (Упоров А.В., Семиглазов В.Ф.).

Таблица 2.

Молекулярно-генетический статус больных РМЖ в зависимости от стадии (n=50)

		T1N0M0 (n=12)	T1N1M0 (n=14)	T2N0M0 (n=13)	T2N1M0(n=11)	Кол-во мутаций
p53	5 экзон	2	3	7	3	15
	6 экзон	7	9	10	11	37
	7 экзон	12	16	15	13	56
	8 экзон	4	5	3	5	17
C-kit	12 кодон	3	2	2	3	10
B-raf	15 кодон	-	4	2	3	11
APC		-	2	1	-	3
K-ras	12,13 кодоны	4	5	5	7	21
E-cadherin	гипермети- лирование	3	4	3	5	15
p16	гипермети- лирование	4	7	6	4	21
Итого		41	57	54	54	206

Выявлены различия молекулярно-генетических изменений у больных различными стадиями РМЖ. При повышении стадии выраженность нарушений увеличивается. При этом, у больных со IIa стадией (T1N1M0) с пораженными регионарными лимфоузлами молекулярно-генетические изменения выражены сильнее по сравнению с больными IIa стадией без поражения лимфоузлов. Мутации гена p 53 в 7 эк, K-ras, E-кадхерин встречаются чаще у больных РМЖ независимо от стадии.

Таблица 3.

Молекулярно - генетический статус больных РМЖ с различным гормональным и HER2/neu фенотипами.

		РЭ-, РП-, HER2/neu (3+) (n=16)	РЭ +++, РП +++, HER2/neu (-) (n=34)
p53	5 экзон	12	3
	6 экзон	18	10
	7 экзон	32	24
	8 экзон	7	9

C-kit	12 кодон	4	6
B-raf	15 кодон	5	5
APC		7	4
K-ras	12,13 кодоны	9	13
E-cadh.	Гиперметирил-е	10	13
p16	Гиперметирил-е	13	2
Итого		117	89
Ki -67	0-35%	5	45
	36-50%	23	27
	51-70%	43	7
	>70%	25	-

Таким образом, мутации генов p 53, E-cadherin, K-ras чаще выявляются при рецептор-отрицательном и HER2/neu (+++) фенотипе.

Выводы:

1. Степень морфологической дифференцировки рака молочной железы коррелирует с экспрессией молекулярно-генетических маркеров.
2. Низкодифференцированные опухоли имеют наибольшее число мутаций (141 мутацию), по сравнению с неоплазиями с высокой дифференцировкой. При этом преобладают мутации генов p53 в 6 и 7х кодонах и гена E-кадхерин.
3. В опухолевых клетках больных РМЖ с низкой степенью дифференцировки определяется более высокая пролиферативная активность, определенная по экспрессии антигена Ki-67.
4. При отсутствии рецепторов эстрогена и прогестерона на поверхности опухолевых клеток наблюдается более агрессивное течение заболевания. У пациентов с такими фенотипами опухолей достоверно чаще встречаются метастазы в регионарные лимфатические узлы.
5. Отсутствие экспрессии рецепторов прогестерона в клетках рака молочной железы сочетается с высокими уровнями экспрессии антигена Ki-67, патологического онкобелка (HER-2/neu). Установлена прямая корреляционная связь между отсутствием рецепторов эстрогена, прогестерона, гиперэкспрессией HER-2/neu (3+) и более высокой пролиферативной активностью опухолевых клеток.
6. Максимальная экспрессия онкобелка HER-2 в клетках опухоли является независимым фактором прогноза клинического течения рака молочной железы, связана с высоким метастатическим потенциалом опухоли и характерна для гормон-негативных фенотипов рака молочной железы.
7. Рецептор-отрицательные и HER-2/neu (3+) фенотипы опухоли РМЖ имеют более неблагоприятный мутационный статус, чем рецептор - положительные и HER-2/neu (-) фенотипы.