

На правах рукописи

**БЕССОНОВ
АЛЕКСАНДР АЛЕКСЕЕВИЧ**

**ОСОБЕННОСТИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ФОРМ РАКА
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 онкология
03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург
2017

Работа выполнена на кафедре общей и молекулярной медицинской генетики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации на базе ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава России

Научный руководитель:

Имянитов Евгений Наумович,

член-корр РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей и молекулярной медицинской генетики ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации, руководитель отдела биологии опухолевого роста и научной лаборатории молекулярной онкологии, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н.Петрова» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Орлова Рашида Вахидовна доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования Санкт-Петербургский государственный университет правительства РФ.

Шавловский Михаил Михайлович доктор медицинских наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики человека ГУ НИИЭМ РАН, профессор кафедры медицинской генетики Федерального государственного бюджетного общеобразовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ

Защита диссертации состоится «_20_» __июня__ 2017 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета при ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (197758, г. Санкт-Петербург, Песочный-2, ул. Ленинградская, д.68).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России и на сайте <http://www.niioncologii.ru/science/thesis>

Автореферат разослан «___» _____ 2017г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук

Е.В. Бахидзе

Актуальность темы

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из наиболее распространенных злокачественных новообразований у женщин [Каприн А.Д. и соавт., 2016; Мерабишвили В.М. и соавт., 2015]. Индивидуальный риск развития заболевания варьируют от 1 на 1732 (0.06%) в возрасте 20-30 лет до 1 на 26 (3.8%) в возрасте 70 лет. Этот же показатель при условии продолжительности жизни более 70 лет составляет 12.3% [DeSantis и др., 2014]. Примерно в 10-30% РМЖ имеется связь с наследственными факторами, однако лишь в 5-10% случаев развитие заболевания обусловлено идентифицируемой генетической аномалией [Melchor и др., 2013; Njiaju и др., 2012]. Мутации в генах BRCA1 и BRCA2 представляют собой одну из наиболее хорошо изученных причин возникновения РМЖ, они ответственны приблизительно за 30% случаев семейных опухолей этой локализации [Narod и др., 2004].

Третьим по значимости геном, мутации в котором обуславливают предрасположенность к РМЖ, является CHEK2. Его связь с РМЖ была выявлена около 10 лет назад; оказалось, что повреждения CHEK2 ответственны за существенную долю наследственного РМЖ в Европе [THE CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium 2004]. Другие гены, мутации в которых сопряжены с высоким риском развития РМЖ - PALB2, BRIP1, NBS1, BLM, RAD51C - на сегодняшний день изучены в меньшей степени. Основной целью идентификации генетических дефектов, ассоциированных с развитием РМЖ, долгое время считалась разработка инструмента выявления здоровых женщин, находящихся в группе высокого риска. Однако на сегодняшний день общепризнанным фактом является то, что наследственный РМЖ может демонстрировать свойства отдельного биологического подтипа и иметь иной профиль лекарственной чувствительности, что требует отличного терапевтического и хирургического подхода к лечению [Имянитов и др., 2013]. Например, РМЖ у носителей мутации BRCA1/2 развивается в результате соматической потери интактного аллеля BRCA и поэтому характеризуются нарушениями в системе репарации ДНК. Это свойство объясняет высокую чувствительность опухолей, ассоциированных с мутацией BRCA1/2, к препаратам платины и ингибиторам PARP [Hennesy и др., 2009; Silver и др., 2010]. Химиочувствительность других форм наследственного РМЖ до сих пор не подвергалась тщательному анализу.

В исследовании, послужившем материалом для диссертационной работы, оценивается эффективность предоперационного лекарственного лечения с использованием цитостатической полихимиотерапии у пациенток с мутациями в генах BRCA1 и CHEK2 в сравнении с больными без мутаций. В основе исследования лежит гипотеза о том, что опухоли, ассоциированные с наследственными мутациями, имеют иной профиль чувствительности к

лекарственному лечению, что, в свою очередь, влияет на общие результаты терапии.

Цель работы

Изучить чувствительность опухолей, ассоциированных с наследственными мутациями в генах BRCA1 и CHEK2 у пациенток с местнораспространенным раком молочной железы.

Задачи:

- 1) Определить особенности чувствительности к стандартным химиотерапевтическим схемам, применяемым в неoadъювантном режиме, у носительниц мутаций в гене BRCA1
- 2) Определить особенности чувствительности к стандартным химиотерапевтическим схемам, применяемым в неoadъювантном режиме, у носительниц мутаций в гене CHEK2
- 3) Сопоставить выраженность клинического и патоморфологического ответа на проводимое неoadъювантное лечение у пациенток с носительством мутаций BRCA1, CHEK2 и без носительства наследственных мутаций.
- 4) Проанализировать связь между статусом нормального аллеля в опухоли и ответом на неoadъювантное химиотерапевтическое лечение у носительниц мутаций BRCA1 и CHEK2.

Научная новизна

1. В рамках исследовательской работы проведен системный анализ эффективности неoadъювантной терапии в трех группах пациенток с местнораспространенным РМЖ: пациентки с мутацией гена BRCA1, пациентки с мутацией гена CHEK2, пациентки без выявленной генетической аномалии.
2. Определена клиническая эффективность различных схем полихимиотерапии в сопоставлении со степенью патоморфологического регресса первичной опухоли и регионарных метастазов у носительниц наследственных мутаций в генах BRCA1, CHEK2, а также у пациенток без мутаций в этих генах.
3. Произведена оценка связи потери гетерозиготности (LOH) при РМЖ, ассоциированном с мутацией BRCA1, и эффективностью неoadъювантной полихимиотерапии.

Научно-практическая значимость

В результате анализа данных установлено обоснование целесообразности проведения молекулярно-генетического тестирования на предмет носительства генетических аномалий пациентам, подлежащим неoadъювантной химиотерапии.

Положения, выносимые на защиту

1. Опухоли, ассоциированные с носительством мутации CHEK2, характеризуются рефрактерностью к неоадьювантной химиотерапии, в частности к антрациклиновой химиотерапии.
2. Опухоли, ассоциированные с мутацией BRCA1, характеризуются высокой чувствительностью к химиотерапии, в частности к антрациклин-содержащим режимам полихимиотерапии.
3. Всем пациентам, подлежащим предоперационному лекарственному лечению, показано проведение молекулярно-генетического тестирования мутаций в генах CHEK2 и BRCA1.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, проанализированы данные первичной медицинской документации, составлена база данных и проведена статистическая обработка материала. Приведенные клинические данные получены и анализированы диссертантом самостоятельно. Анализ, обобщение полученных результатов, формулирование выводов, практических рекомендаций выполнены автором лично.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на II Петербургском онкологическом форуме «Белые ночи».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них – 6 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 115 страницах машинописного текста на русском языке и состоит из введения, 3 глав, выводов, практических рекомендаций и списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 17 таблицами, 3 рисунками. Библиографический указатель включает 228 публикаций, в том числе 18 отечественных и 210 зарубежных.

Внедрение результатов исследования

Результаты настоящего исследования используются при планировании и оценке результатов лечения больных раком молочной железы в клинике ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Отбор пациентов

Для проведения диссертационной работы были использованы данные пациенток с РМЖ, проходивших лечение в НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова с 2000 по 2010 гг. Из 7028 больных, проходивших лечение в указанный период, 1688 получали неoadьювантную терапию. Для увеличения доли пациенток с мутациями в анализ были включены больные моложе 50 лет. 788 пациенток соответствовали данным критериям, у 462 из них материал опухолевой ткани в виде парафиновых блоков был получен из архива лаборатории патоморфологии. Исследование проводилось при соответствующем одобрении со стороны этического комитета СПбГПМУ.

Экстракция ДНК

Здоровые ткани, удаленные блоком при проведении хирургического вмешательства, служили источником ДНК. Экстракция производилась из фиксированных формалином, помещенных в парафин образцов при помощи метода с применением фенол-хлороформной экстракции, ранее описанного в работе (Имянитов и соавт., 2006).

Генотипирование наиболее часто встречающихся в российской популяции мутаций в генах BRCA1 и CHEK2 (Табл. 1) выполнялось при помощи аллель-специфической ПЦР.

Таблица 1: Список определявшихся «фаундер»-мутаций, их локализация и последовательность

Ген	Мутация	Экзон	Тип мутации	Эффект мутации на уровне белка	Домен
BRCA1	185delAG	2	Сдвиг рамки считывания	«трункирующий»	Цинкосодержащая пальцеобразная область
BRCA1	4153delA	11	Сдвиг рамки считывания	«трункирующий»	Комплекс экзонов 11–13
BRCA1	5382 insC	20	Сдвиг рамки считывания	«трункирующий»	BRCT
CHEK2	IVS2+1G>A	3	Замена, сдвиг рамки считывания	«трункирующий»	Сплайс-сайт экзона 2
CHEK2	del5395	9 + 10	Делеция	«трункирующий»	Киназный
CHEK2	1100insC	10	Сдвиг рамки считывания	«трункирующий»	Киназный

Оценка лечебного эффекта

Для проведения оптимальной оценки лечебного эффекта на основании данных архивных историй болезни (клинический размер опухолевого узла, данные маммографии, данные УЗ-исследования) было произведено стадирование опухолей на этапе до начала лечения в соответствии с последней версией классификации TNM UICC.

Наименьшие, по данным обследования, размеры опухоли были использованы для стадирования (в соответствии с рекомендациями UICC). Оценка лечебного эффекта производилась после общего завершения неoadьювантной терапии. Для оценки лечебного эффекта была использована модифицированная версия критериев RECIST 1.0 (<http://www.recist.com/recist-comparative/index.html>)

Клиническая оценка лечебного эффекта, установленная лечащим врачом, принималась во внимание, однако производился пересмотр ответа на основании архивных данных объективной оценки (маммография, УЗИ, КТ). Наибольшие размеры опухолевых очагов по данным маммографии, УЗИ и клинического осмотра/пальпации были сравнены с соответствующими размерами по завершении неoadьювантной терапии.

Клинический ответ на проведенное неoadьювантное лечение сравнивался с результатом патоморфологического исследования операционного материала. На основании данных патоморфологического заключения выполнялось стадирование по действующей системе pTNM UICC. Если по результатам стадирования pTNM стадия заболевания оказывалась выше, чем изначальная клиническая стадия cTNM, результат расценивался как случай неэффективности химиотерапевтического лечения, так как снижения стадии заболевания не было достигнуто. При наличии остаточной опухоли производилась оценка значимости резидуальной опухолевой нагрузки (RCB). Для расчета остаточной опухолевой нагрузки использовались данные патоморфологического заключения. Для внедрения параметра клеточности использовалось среднее значение клеточности для соответствующей стадии лечебного патоморфоза по системе Miller-Payne. При высокой степени опухолевой нагрузки (относимой к классу 3), результат оценивался как случай неэффективности неoadьювантного лечения. Во всех остальных случаях результат оценивался как ответ на лечение. Ответ расценивался как полный патоморфологический регресс (pCR) при отсутствии опухолевой ткани инвазивного рака как в молочной железе, так и в регионарных лимфоузлах по результатам хирургического лечения.

Результаты

Генотипирование 6 «фаундер»-мутаций (BRCA1 5382insC [c.5266dupC], BRCA1 4153delA [c.4034delA], BRCA1 185delAG [c.68_69delAG]), CHEK2 1100delC [c.1100delC], CHEK2 del5395 [del ex9-10], и CHEK2 IVS2+1G>A [c.444+1G>A]) было успешным у 415 пациентов. Также в некоторых случаях были использованы результаты изучения полной кодирующей последовательности гена BRCA1, опубликованные ранее (Iyevleva, 2010)

Мутация BRCA1 была обнаружена у 19 (4.6%) женщин, а у 7 (1.9%) пациенток была выявлена мутация в гене CHEK2. Детальное описание случаев с носительством мутаций BRCA1 и CHEK2 представлено в Таблице 2.

Как и ожидалось, опухоли с мутацией BRCA1 значительно чаще являлись ЭР-негативными (86.7% против 39.4%, $p = 0.0006$) или трижды негативными (80.0% vs. 25.8%, $p = 0.0001$) в сравнении со случаями РМЖ у пациентов без наследственных мутаций. Рецепторный статус не отличался в CHEK2-ассоциированных опухолях и карциномах от больных без мутаций.

С целью определения взаимосвязи между потерей гетерозиготности в ткани опухоли и чувствительностью к лекарственному лечению было произведено исследование доступных образцов крови пациенток или же исследование материала опухолевых блоков (Таблица 2).

Табл. 2: Клинические характеристики опухолей у пациентов с носительством мутаций в генах BRCA1 и CHEK2

#	ID	Мутация	Воз раст	TNM	Статус рецепторов	Схема НАПХТ	Клинический ответ	pCR	Ткань для тестирования на потерю гетерозиготности	Статус аллеля дикого типа в ткани опухоли
Носители мутации BRCA1										
1	157	BRCA1 4153delA	34	T1N3M0	ER+/PR+/HER2+	TAC	PR	Нет	Мат. биопсии	Потеря
2	160	BRCA1 5382insC	39	T4N2M0	ER-/PR-/HER2-	FAC, доцетаксел	SD (после FAC), PD (после доцетаксела)	Нет	Хирургич. материал	Потеря
3	204	BRCA1 5382insC	46	T2N1M0	ER-/PR-/HER2-	TAC	PD	Нет	Хирургич. материал	Потеря
4	117	BRCA1 5382insC	27	T2N2M0	ER-/PR-/HER2-	FAC	PR	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
5	150	BRCA1 5382insC	37	T3N1M0	ER-/PR-/HER2-	TAC	PR	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
6	128	BRCA1 5382insC	31	T2N2M0	ER-/PR-/HER2-	FEC	PR	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
7	307	BRCA1 5382insC	49	T2N2M0	ER-/PR-/HER2-	FEC	PR	Да	Мат. биопсии	Сохранен
8	88	BRCA1 5382insC	46	T1N2M0	ER-/PR-/HER2-	FAC+RT	SD	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
9	372	BRCA1 5382insC	47	T4N2M0	ER-/PR-/HER2-	FAC	PR	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
10	116	BRCA1 5382insC	43	T2N1M0	ER-/PR-/HER2-	FAC	CR	Да	Мат. биопсии	Сохранен
11	147	BRCA1 R1699W	30	T3N2M0	ER-/PR-/HER2-	FEC, TAC	SD (после FEC), PD (после TAC)	Нет	НД	НД
12	333	BRCA1 5382insC	39	T2N1M0	Nd	FAC	PR	Да	НД	НД
13	407	BRCA1 5382insC	36	T4N2M0	Nd	FEC	PR	Да	НД	НД
14	178	BRCA1 5382insC	50	T2N2M0	ER-/PR-/HER2-	FAC	CR	Да	НД	НД
15	68	BRCA1 5382insC	44	T2N1M0	Nd	CMF	SD	Да	НД	НД
16	431	BRCA1 5382insC	40	T2N1M0	Nd	CMF	PR	Нет	НД	НД
17	27	BRCA1 185delAG	49	T3N0M0	ER+/PR+/HER2-	CMF	PR	Нет	НД	НД

18	223	BRCA1 5382insC	43	T2N1M0	ER-/PR+/HER2-	АТ, CMF	PR (после АТ), PR (после CMF)	Нет	НД	НД
19	43	BRCA1 4153delA	47	T2N2M0	ER-/PR-/HER2-	Винорельбин +АС	PR	Нет	НД	НД
Носители мутации CHEK2										
1	161	CHEK2 ex9-10 del	45	T4N1M0	ER+/PR+/HER2-	FEC+лучевая терапия	PR	Нет	Хирургич. материал	Потерян
2	153	CHEK2 1100delC	47	T4N2M0	ER+/PR-/HER2-	FEC, доцетаксел	SD (после FEC), PR (после доцетаксела)	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
3	44	CHEK2 ex9-10 del	35	T4N2M0	ER+/PR+/HER2-	FAC	SD	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
4	65	CHEK2 ex9-10 del	40	T4N0M0	ER-/PR-/HER2+	FAC	SD	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
5	240	CHEK2 ex9-10 del	48	T2N2M0	ER-/PR-/HER2-	FEC, доцетаксел	SD после FEC), PR (после доцетаксела)	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
6	59	CHEK2 ivs2+1G>A	49	T2N1M0	ER+/PR-/HER2-	FAC	PD	Нет	Хирургич. материал	Сохранен
7	162	CHEK2 ivs2+1G>A	36	T4N1M0	ER+/PR+/HER2-	TAC	SD	Нет	Не доступен	НД

Распределение схем неoadьювантной терапии

При проведении лечения использовались различные режимы химиотерапии. Для проведения анализа режимы были разделены на «антрациклиновые» - схемы, содержащие антрациклиновые антибиотики без использования таксанов («А»); режимы, содержащие таксаны или другие препараты, воздействующие на микротрубочки (сочетающиеся с антрациклинами, либо примененные после антрациклинов, либо не содержащие антрациклины) («Т»); и все прочие режимы. Большинство пациенток (260/415, 63%) получали антрациклиновую терапию, 122 пациентки (29%) получали терапию таксан-содержащими режимами и 33 (8%) - другие режимы. В группе антрациклиновой терапии «А» наиболее частым режимом химиотерапии был режим FAC (5-фторурацил, доксорубин, циклофосфамид), который получали 208 пациентов, и режим FEC (5-фторурацил, эпирубинин, циклофосфамид) – 45 пациентов. В группе «Т» наиболее часто использованным режимом была схема TAC (доксорубин, циклофосфамид, доцетаксел). Среди прочих схем, не содержащих антрациклины и/или таксаны, превалировала схема CMF (циклофосфамид, метотрексат, 5-фторурацил). Число циклов терапии варьировало, большинство пациентов получили от 2х до 6 циклов.

Связь ответа на проводимое лечение с носительством мутации генов BRCA1, CHEK2 и другими клиническими характеристиками пациенток

Повышенная вероятность достижения полного патоморфологического регресса была связана с отрицательным статусом рецепторов стероидных гормонов или трижды-негативным подтипом. Наличие мутации BRCA1 и первичной опухоли стадии (T1-T2) также было ассоциировано с повышением вероятности достижения полного патоморфологического регресса ($p = 0.092$ **Ошибка! Источник ссылки не найден.**). Ни у одной из 7 пациенток с мутацией CHEK2 не был достигнут полный патоморфологический регресс.

Частота общего ответа на лечение (частота достижения частичного регресса + частота достижения полного клинического регресса) среди пациенток с мутациями CHEK2 составила 4/7 (57.1%), среди пациенток без наследственных мутаций - 333/388 (85.5%), среди больных с мутациями BRCA1 – 14/19 (73.7%; $p = 0,375$).

Также была проведена оценка взаимосвязи между клиническими характеристиками пациентов (Таблица 3,4), наличием мутации (Таблица 5) и реакцией на проводимую цитостатическую терапию. При опухолях, ассоциированных с мутациями BRCA1, отмечалась значительно более высокая частота достижения полного патоморфологического регресса при проведении полихимиотерапии с применением антрациклинов, нежели у пациентов без носительства мутации. При этом носительство мутации BRCA1 оказывало негативное влияние на эффективность таксан-содержащих режимов. Полный патоморфологический регресс (pCR) не был достигнут ни у одной пациентки BRCA1-мутацией, получавшей антрациклины и таксаны – 0/7 (0%), а в группе

женщин без мутаций частота полного патоморфологического регресса составила 13.1% - 16/112 ($p=0.592$).

Обратная тенденция была обнаружена для СNEK2-ассоциированного РМЖ. Ни у одной из 4 пациенток, получавших антрациклиновую химиотерапию, не был достигнут полный патоморфологический регресс. Лишь в одном случае имел место частичный регресс в результате проводимого лекарственного лечения ($p = 0,008$); однако при проведении терапии таксанами у 2 из 3 пациенток (66.7%) был зафиксирован частичный регресс ($p = 0,284$).

Таблица 3: Частота полного патоморфологического регресса (pCR), у пациентов, получавших неоадьювантную химиотерапию

Клинические характеристики	Число пациентов	Частота достижения pCR (%)	Значение p
Возраст (n = 415)			
>40 лет	296	35 (11.8%)	0.514
</=40 лет	119	17 (14.3%)	
Клиническая стадия опухоли (n = 414)			
T1-2	154	25 (16.2%)	0.092
T3-4	260	27 (10.4%)	
Клиническая стадия регионарных лимфоузлов (n = 415)			
N0	34	4 (11.8%)	1.000
N1-3	381	48 (12.6%)	
Статус ЭР (n = 241)			
Положительные	140	10 (7.1%)	0.023
Отрицательные	101	17 (16.8%)	
Статус ПР (n = 241)			
Положительные	123	7 (5.7%)	0.007
Отрицательные	118	20 (17.0%)	
Статус HER2 (n = 232)			
Гиперэкспрессия	39	2 (5.1%)	0.541
Нет гиперэкспрессии	193	18 (9.3%)	
Трижды-негативный РМЖ (n = 240)			
Да	69	15 (21.7%)	0.003
Нет	171	12 (7.0%)	
Гистологический тип (n = 197)			
Протоковый рак (NST)	170	4 (2.4%)	1.000
Прочие типы	27	0 (0.0%)	
Наследственные мутации (n = 415)			
Без носительства мутации	388	46 (11.9%)	0.024 (носители мутации <i>BRCA1</i> в сравнении с пациентами с диким типом гена) 0.604 (носители мутации <i>CHEK2</i> в сравнении с пациентами с диким типом гена) 0.136 (носители мутации гена <i>BRCA1</i> в сравнении с носителями мутации <i>CHEK2</i>)
Носители мутации <i>BRCA1</i>	19	6 (31.6%)	
Носители мутации <i>CHEK2</i>	7	0 (0.0%)	
Тип химиотерапии (n=415)			
Таксан-содержащий режим (с- или	122	16 (13.1%)	1.000 (таксан-содержащие

без добавления антрациклинов в состав схемы)			режимы против антрациклиновых режимов) 0.766 (таксан-содержащие режимы против прочих режимов) 0.780 (антрациклин-содержащие против прочих)
Антрациклиновые режимы (без применения таксанов)	260	33 (12.7%)	
Прочие режимы	33	3 (9.1%)	

Таблица 3: Частота объективного ответа среди пациентов, получавших неоадьювантную терапию

Клинические характеристики	Число пациентов	Частота объективного ответа (%)	Значение <i>p</i>
Возраст (n = 415)			
>40 лет	296	253 (85.5%)	0.453
</=40 лет	119	98 (82.4%)	
Клиническая стадия первичной опухоли (n = 414)			
T1-2	154	124 (80.5%)	0.092
T3-4	260	226 (87.0%)	
Клиническая стадия регионарных лимфоузлов (n = 415)			
N0	34	25 (73.5%)	0.080
N1-3	381	326 (85.6%)	
Статус рецепторов эстрогенов (n = 241)			
Позитивные	140	118 (84.3%)	0.456
Негативные	101	89 (88.1%)	
Статус рецепторов прогестерона (n = 241)			
Позитивные	123	103 (83.7%)	0.359
Негативные	118	104 (88.1%)	
Статус рецепторов HER2 (n = 232)			
Гиперэкспрессия	39	35 (89.7%)	0.616
Нет гиперэкспрессии	193	164 (85.0%)	
Принадлежность к трижды негативному типу (n = 240)			
Да	69	60 (87.0%)	0.833
Нет	171	150 (87.7%)	
Гистологический тип (n = 197)			
NST	170	143 (84.1%)	0.381
Прочие	27	25 (92.6%)	
Степень ядерной атипии (n = 140)			
1-2	86	76 (88.4%)	0.322

3	54	44 (81.5%)	
Наследственные мутации (n = 415)			
“Дикий тип»	388	333 (85.5%)	0.177 (носители мутации <i>BRCA1</i> против пациентов с «диким типом») 0.020 (носители мутации <i>CHEK2</i> против пациентов с «диким типом») 0.375 (носители мутации <i>CHEK2</i> против носителей мутации <i>BRCA1</i>)
носители мутации <i>BRCA1</i>	19	14 (73.7%)	
носители мутации <i>CHEK2</i>	7	4 (50.0%)	
Тип химиотерапевтического лечения (n=415)			
Таксан-содержащие режимы (с добавлением антрациклинов или без антрациклинов)	122	107 (87.7%)	0.871 (таксан-содержащие режимы против антрациклиновых режимов) 0.0001 (таксан-содержащие режимы против прочих) 0.0001 (антрациклиновые режимы против прочих)
Антрациклиновые режимы (без добавления таксанов)	260	226 (87.0%)	
Прочие режимы	33	18 (54.5%)	

Таблица. 4: Эффективность различных режимов химиотерапии у BRCA1-носительниц, CHEK2-носительниц и у пациенток без мутаций

		Носители мутации BRCA1		Носители мутации CHEK2		Пациенты с «диким типом»		Значение P					
		pCR	OR	pCR	OR	pCR	OR	pCR			OR		
Тип химиотерапии								носители мутации BRCA1 против пациентов с «диким типом»	носители мутации CHEK2 против пациентов с «диким типом»	носители мутации CHEK2 против носителей мутации BRCA1	носители мутации BRCA1 против пациентов с «диким типом»	носители мутации CHEK2 против пациентов с «диким типом»	носители мутации CHEK2 против носителей мутации BRCA1
Таксан-содержащие режимы (с добавлением антрациклинов или без антрациклинов)	-	0/7 (0.0%)	4/7 (57.1%)	0/3 (0.0%)	2/3 (66.7%)	16/112 (13.1%)	101/112 (90.2%)	0.592	1.000	1.000	0.035	0.284	1.000
Антрациклиновые режимы (без добавления таксанов)	-	5/9 (55.6%)	8/9 (88.9%)	0/4 (0.0%)	1/4 (25.0%)	28/247 (11.3%)	217/247 (87.9%)	0.002	1.000	0.105	1.000	0.008	0.052
Прочие режимы	-	1/3 (33.3%)	2/3 (66.7%)	0/0 (0.0%)	0/0 (0.0%)	2/29 (6.9%)	15/29 (51.7%)	0.263	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Значение P	таксан-содержащие режимы против антрациклиновых режимов	0.034	0.261	1.000	0.486	0.486	0.594						
	таксан-содержащие режимы против прочих	0.300	1.000	1.000	1.000	0.366	0.00001						
	антрациклиновые режимы против прочих	1.000	0.455	1.000	0.400	0.752	0.00001						

Обсуждение результатов

Данные по эффективности неoadъювантной терапии при РМЖ с наследственными мутациями гена BRCA1 и CHEK2 остаются ограниченными. В данном исследовании впервые был проведен системный анализ результатов неoadъювантной терапии у носительниц мутаций в генах BRCA1 и CHEK2 в сравнении с контрольной группой пациенток без наследственных мутаций.

Высокая частота объективного ответа на лечение, зафиксированная в группе пациенток без генетических аномалий, вероятнее всего объясняется особенностями изучаемой выборки. Во-первых, в исследование включались пациентки моложе 50 лет. Кроме того, 108 из 422 проанализированных опухолей относятся к HER2-позитивному и трижды-негативному подтипам, которые характеризуются высокой частотой ответов на неoadъювантное лекарственное лечение. Среди остальных случаев, по-видимому, преобладал люминальный В подтип. На это указывает превалирование опухолей с высокой гистологической степенью злокачественности среди пациенток с положительной экспрессией рецепторов эстрогенов. В исследование включались пациентки, получавшие неoadъювантную терапию с 2000 года, когда такое лечение проводилось преимущественно в случаях первично-неоперабельного состояния. Поэтому можно сделать предположение о том, что большая часть исследуемой когорты представлена относительно молодыми больными с достаточно агрессивным течением заболевания, обратившимися за медицинской помощью на стадии местно-распространенного процесса.

Результаты данного диссертационного исследования подтверждают высокую чувствительность опухолей, ассоциированных с мутациями BRCA1, к антрациклин-содержащей химиотерапии [Byrski и др., 2012; Fourquet и др., 2009; Wong Wong Keet и др., 2009]. Также получены данные об относительно ограниченной чувствительности опухолей, ассоциированных с мутацией BRCA1, к таксан-содержащим режимам.

Полученные данные находятся в соответствии с имеющимся представлением о роли гена BRCA1 в реализации механизмов апоптоза, опосредованного действием таксанов. Исследования на клеточных линиях показали, что дефицит гена BRCA1 ассоциирован с низкой чувствительностью к терапии паклитакселом [Имянитовит др., 2011). Помимо вышеупомянутого исследования Byrski, в работах [Wysocki и др., 2008] и [Kriege и др., 2012] была продемонстрирована низкая частота ответов на терапию доцетакселом у носителей мутации BRCA1.

Анализируя обобщенные данные исследований по эффективности неoadъювантной терапии в лечении химио-наивного РМЖ, ассоциированного с носительством мутации BRCA1, и результаты приведенного исследования, можно сделать вывод о том, что добавление таксанов к антрациклин-содержащей

химиотерапии у данной категории пациентов как минимум не улучшает результаты лечения. Данное наблюдение является основанием для дальнейшего изучения целесообразности применения таксанов при лечении ранних стадий РМЖ, ассоциированного с носительством мутации BRCA1.

Необходимо упомянуть, что нормальное функционирование гена BRCA2 не является необходимым условием для действия стабилизаторов микротрубочек. На сегодняшний день нет наблюдений, указывающих на то, что мутация BRCA2 может оказывать негативное влияние на эффективность терапии таксанами [Имянитов и др., 2011].

В противоположность пациенткам с мутациями BRCA1, больные с опухолями, ассоциированными с мутацией гена CHEK2, продемонстрировали худший ответ на лечение.

Общая частота полного патоморфологического регресса без спецификации по режимам применяемой химиотерапии среди пациенток с BRCA1-мутациями составила 31% (6/19), в группе больных без мутаций - 11% (46/388), а в группе пациенток с мутацией CHEK2 случаев полного регресса не было зафиксировано – 0% (0/7). Также отмечена особенно низкая эффективность терапии антрациклинами в данной группе больных: ни у одной из 4х пациенток, получавших антрациклиновую химиотерапию без добавления таксанов, не был зафиксирован объективный ответ на проводимое лечение. Полученные данные соответствуют наблюдениям, представленным Chrizanthar и соавт [Chrizanthar и др., 2008]. Частота объективного ответа на терапию таксанами среди пациентов с мутацией CHEK2 в проведенном исследовании является приемлемой, что указывает на целесообразность дальнейшего изучения роли этих препаратов в терапии CHEK2-ассоциированного РМЖ.

Концепция инактивации гена в результате так называемого «второго удара» является доказанным механизмом развития большинства злокачественных новообразований, ассоциированных с наследственными дефектами BRCA1 и BRCA2 [Cornelis и др., 1995; Collins и др., 1995]. В данном исследовании не удалось выявить четкой взаимосвязи между потерей гетерозиготности BRCA1 и ответом на проводимое лечение. Примечательно, что лишь в 3х из 10 случаев, доступных для анализа на потерю гетерозиготности, была обнаружена потеря аллеля «дикого типа». В 2х из этих 3х случаев наблюдалась прогрессия заболевания на фоне проводимого лечения с использованием таксанов. Это косвенно подтверждает то, что для реализации индуцируемого таксанами апоптоза необходима сохраненная функция гена BRCA1. У 2х женщин без признаков потери гетерозиготности гена BRCA1 был отмечен полный патоморфологический регресс в результате применения антрациклиновых режимов химиотерапии. Данное явление может объясняться другими генетическими или эпигенетическими механизмами инактивации аллеля дикого

типа. Потеря нормальной копии гена при РМЖ, ассоциированном с мутацией СНЕК2, происходит редко [Суспицын и др., 2014]. При проведении данного диссертационного исследования потеря гетерозиготности была обнаружена у 1 из 7 пациенток.

Выполненное исследование предоставляет дополнительные данные, указывающие на существенные различия в биологии спорадического рака молочной железы и РМЖ, ассоциированного с наследственными мутациями. Представленные ниже выводы могут оказать влияние на подготовку и проведение клинических исследований, а также на рутинную практику.

Выводы

- 1) Опухоли, ассоциированные с носительством мутации BRCA1 чаще являются трижды-негативными.
- 2) Опухоли, ассоциированные с мутацией CHEK2 не отличимы от опухолей без выявленной генетической аномалии при оценке статуса гормональных рецепторов, гистологической степени злокачественности и прочих фенотипических характеристик.
- 3) У носительниц мутаций в гене BRCA1 частота достижения полного патоморфологического регресса существенно выше, нежели у больных без мутаций (6/19 (31.6%) против 46/388 (11.9%), $p = 0.024$).
- 4) Частота достижения полного патоморфологического регресса при BRCA1-ассоциированном РМЖ особенно высока при проведении неоадьювантной терапии с применением антрациклинов. При лечении пациенток антрациклиновыми режимами без добавления таксанов частота полного регресса в 5 раз превышала таковую у больных без мутаций BRCA1 (5/9 (55.6%) vs. 28/247 (11.3%), $p = 0.002$). Антрациклины остаются значимым компонентом лечения пациенток с РМЖ, ассоциированным с носительством мутации гена BRCA1.
- 5) В неоадьювантном режиме у пациенток с мутациями BRCA1 таксан-содержащие схемы менее эффективны, чем схемы, содержащие только антрациклины (не было зафиксировано ни одного случая полного патоморфологического регресса при использовании таксан-содержащих схем среди носителей мутации BRCA1).
- 6) РМЖ, ассоциированный с носительством мутаций в гене CHEK2, характеризуется низкой чувствительностью к неоадьювантной химиотерапии по сравнению со спорадическим РМЖ: частота объективного ответа составила 57.4% против 85.5%, частота достижения полного патоморфологического регресса - 0% против 11.3%, соответственно.
- 7) РМЖ, ассоциированный с носительством мутаций в гене CHEK2, характеризуется крайне низкой чувствительностью к терапии антрациклинами: ни у одной пациентки, получавшей антрациклиновые режимы без применения таксанов, не был достигнут частичный регресс.

Практические рекомендации

При планировании неоадьювантной терапии всем пациенткам в возрасте до 50 лет, вне зависимости от биологического подтипа РМЖ, целесообразно проводить тестирование на предмет носительства «founder»-мутаций в генах BRCA1 и CHEK2, так как выявление носительства мутации может оказать

влияние на принятие решения о тактике лекарственного лечения и объеме хирургического вмешательства.

В связи с высокой чувствительностью опухолей, ассоциированных с носительством мутации BRCA1, к антрациклинам, целесообразно применение данных препаратов в неoadъювантном режиме для повышения вероятности достижения полного регресса.

В связи с потенциальной рефрактерностью к химиотерапии опухолей, ассоциированных с носительством мутации CHEK2, при выявлении носительства мутации CHEK2 целесообразно проводить неoadъювантное лечение только пациенткам с первично-неоперабельным РМЖ. Предпочтение должно отдаваться схемам, содержащим таксаны.

Целесообразно проведение проспективных исследований, направленных на оценку эффективности различных режимов химиотерапии у пациенток с мутацией CHEK2 для получения данных большей статистической силы и дальнейшей индивидуализации лечения.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бессонов А.А., Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н., Соколенко А.П. Наследственный рак молочной железы, ассоциированный с мутациями в гене CHEK2 // Вопросы онкологии. – 2016. – Т. 62. – № 6. – С. 753-757.
2. 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.Y., Togo A.V., Imyanitov E.N. Breast cancer sensitivity to neoadjuvant therapy in BRCA1 and CHEK2 mutation carriers and non-carriers // Breast Cancer Res. Treat. – 2014. – Vol. 148(3). – P. 675-683.
3. Sokolenko A.P., Bogdanova N., Kluzniak W., Preobrazhenskaya E.V., Kuligina E.S., Iyevleva A.G., Aleksakhina S.N., Mitiushkina N.V., Gorodnova T.V., Bessonov A.A., Togo A.V., Lubiński J., Cybulski C., Jakubowska A., Dörk T., Imyanitov E.N. Double heterozygotes among breast cancer patients analyzed for BRCA1, CHEK2, ATM, NBN/NBS1, and BLM germ-line mutations // Breast Cancer Res. Treat. – 2014. – Vol. 145(2). – P. 553-562.
4. Suspitsin E.N., Yanus G.A., Sokolenko A.P., Yatsuk O.S., Zaitseva O.A., Bessonov A.A., Ivantsov A.O., Heinstein V.A., Klimashevskiy V.F., Togo A.V., Imyanitov E.N. Development of breast tumors in CHEK2, NBN/NBS1

and BLM mutation carriers does not commonly involve somatic inactivation of the wild-type allele // *Med. Oncol.* – 2014. – Vol. 31(2). – P. 828.

5. Семиглазов В.Ф., Манихас А.Г., Семиглазов В.В., Божок А.А., Дашян Г.А., Иванов В.Г., Палтуев Р.М., Васильев А.Г., Щедрин Д.Е., Ермаченкова А.М., Никитина И.В., Пеньков К.Д., Бессонов А.А., Табагуа Т.Т., Коларькова В.В. Подтипы рака молочной железы и их гормонально-метаболическое «обеспечение» прикладной аспект // *Вопросы онкологии.* – 2011. – Т. 57. – № 5. – С. 559-567.
6. Semiglazov V.F., Paltuev R.M., Nikitina I.V., Semiglazov V.V., Dashyan G.A., Bozjok A.A., Manikhas A.G., Bessonov A.A., Vasiliev A.G., Penkov K.D. Factors influencing prognosis in node-negative early breast cancer (p)T1N0M0 // *The Breast.* – 2011. – Vol. 20, Suppl.1. – P. S39.
7. Семиглазов В.Ф., Манихас А.Г., Семиглазов В.В., Божок А.А., Дашян Г.А., Иванов В.Г., Палтуев Р.М., Васильев А.Г., Щедрин Д.Е., Ермаченкова А.М., Никитина И.В., Пеньков К.Д., Бессонов А.А., Табагуа Т.Т., Коларькова В.В. Адьювантная эндокринотерапия гормон-рецептор-положительного РМЖ // VIII международная ежегодная конференция «Проблемы диагностики и лечения молочной железы». Материалы конференции. Санкт-Петербург. – 2011. – С.117-133.
8. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Дашян Г., Бессонов А., Палтуев Р., Семиглазова Т., Гречухина И., Пеньков К., Васильев А.Г., Манихас А. Опухолевые маркеры при раке молочной железы // *Врач.* – 2011. - № 12. – С. 2-7.
9. Семиглазов В.Ф., Манихас А.Г., Семиглазов В.В., Божок А.А., Дашян Г.А., Иванов В.Г., Палтуев Р.М., Васильев А.Г., Щедрин Д.Е., Ермаченкова А.М., Никитина И.В., Пеньков К.Д., Бессонов А.А., Табагуа Т.Т., Коларькова В.В. Отдаленные результаты адьювантной эндокринотерапии гормон-рецепторположительного рака молочной железы // *Вопросы онкологии.* – 2011. – Т. 57. – № 5. – С. 567-577.
10. Семиглазов В.Ф., Манихас А.Г., Божок А.А., Дашян Г.А., Васильев А.Г., Петровский С.Г., Мацко Д.Е., Семиглазов В.В., Палтуев Р.М., Иванов В.Г., Зернов К.Ю., Донских Р.В., Бессонов А.А., Шамина Е.А. Неoadьювантная терапия рака молочной железы с повышенной экспрессией HER-2 // *Фарматека.* – 2010. – № 14(28). – С. 12-15.

11. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., Бессонов А.А., Палтуев Р.М., Зернов К.Ю., Пеньков К.Д. Основные результаты клинических исследований в онкологии в первой половине 2010 г. // Фарматека. – 2010. – № 17. – С. 12-17.
12. Семиглазов В.Ф., Манихас А.Г., Семиглазова Т.Ю., Бессонов А.А., Семиглазов В.В. Неоадъювантная системная терапия рака молочной железы. Руководство для врачей. – СПб.: Аграф+, 2012. – 112 с.