

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ОНКОЛОГИИ ИМЕНИ Н.Н. ПЕТРОВА» МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ЛАПТИЕВ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:
член-корр. РАН, д.м.н., проф.
Имянитов Евгений Наумович,
к.б.н., доц.
Корженевская Марина Анатольевна

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2020

СОДЕРЖАНИЕ:

Актуальность темы.....	6
Глава 1. Обзор литературы	
Роль генетических факторов в развитии рака молочной железы.....	16
Протоонкогены	19
Антионкогены	25
Роль продуктов антионкогенов при прохождении клеточного цикла	27
«Двухударная» модель развития рака.....	30
Наследственный рак молочной железы.....	32
Семейные формы рака	33
Характер наследования рака молочной железы.....	34
<i>BRCA</i> -ассоциированный рак молочной железы.....	35
Другие гены, ассоциированные с наследственным раком молочной железы.....	39
Распространенность мутаций в генах наследственного рака молочной железы в России.....	42
Значение выявления наследственных форм рака молочной железы.....	46
Неoadьювантное лечение рака молочной железы.....	47
Химиочувствительность наследственного рака молочной железы.....	49
Глава 2. Материалы и методы	
Дизайн научного исследования.....	52
Этапы исследовательской работы.....	52
Проспективный набор материала для исследования.....	52
Ретроспективная группа.....	54

Методы исследования.....	55
Молекулярно-генетическая идентификация <i>CHEK2</i> -, <i>NBS1</i> - и <i>BLM</i> - ассоциированного рака молочной железы.....	55
Выделение ДНК из клеток крови.....	55
Выделение ДНК из парафиновых блоков.....	55
Идентификация мутаций.....	56
Получение и молекулярно-биологическая характеристика клеточных культур наследственного рака молочной железы, обусловленного мутациями в генах <i>CHEK2</i> , <i>NBS1</i> и <i>BLM</i>	59
Перевивка опухолей в культуру клеток.....	59
Молекулярно-биологическая характеристика полученных клеточных культур.....	60
Тестирование чувствительности клеточных линий к химиопрепаратам...	62
Изучение молекулярно-биологических и клинических параметров <i>CHEK2</i> -, <i>NBS1</i> - и <i>BLM</i> -ассоциированных опухолей молочной железы среди пациенток.....	63
Изучение химиочувствительности <i>CHEK2</i> -, <i>NBS1</i> - и <i>BLM</i> - ассоциированных опухолей молочной железы среди пациенток с неoadьювантной терапией.....	64
Шкала RECIST 1.1.....	66
Статистическая обработка полученных результатов исследования.....	66
 Глава 3. Результаты	 68
 Результаты молекулярно-генетического скрининга среди пациенток с раком молочной железы.....	 68
Получение и молекулярно-биологическая характеристика клеточных линий наследственного рака молочной железы.....	76
Пролиферативная активность культур опухолевых клеток.....	76

Изучение молекулярно-биологических характеристик клеточных линий.....	78
Анализ химиочувствительности клеточных линий к лекарственным препаратам.....	83
Молекулярно-биологические и клинические особенности <i>CHEK2</i> -, <i>NBS1</i> - и <i>BLM</i> -ассоциированных карцином молочной железы у пациенток.....	88
Средний возраст пациенток.....	88
Размер и распространенность опухоли.....	90
Поражение регионарных лимфатических узлов.....	90
Оценка молекулярно-биологического подтипа рака.....	90
Анализ химиочувствительности <i>CHEK2</i> -, <i>NBS1</i> - и <i>BLM</i> - ассоциированных карцином молочной железы у пациенток с неoadьювантным лечением.....	91
Глава 4. Обсуждение и заключение	96
ВЫВОДЫ.....	101
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	103

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ И ТЕРМИНОВ:

РМЖ - рак молочной железы

МЖ - молочная железа

РЯ - рак яичников

КЦ - клеточный цикл

ПК - протеинкиназа

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ХТ - химиотерапия

РТ - радиотерапия

КЛ - клеточная линия

ПКО - полный клинический ответ

ОО - объективный ответ

ЧКО - частичный клинический ответ

ПЗ - прогрессирование заболевания

СЗ - стабилизация заболевания

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 C.R. et al., 2007]. Показано, что *BRCA1*-мутантные опухолевые клетки молочной железы, 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 молочной железы [Iyevleva A.G. et al., 2016, Moiseyenko V. M. et al., 2010]. Предиктивное 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 молочной железы, 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 и клинической специфичности фенотипа опухолевых клеток, потенциально пригодных для персонализации терапевтического подхода.

Основная задача нашей работы состоит в молекулярно-генетической идентификации *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных случаев РМЖ на дооперационном этапе, получении соответствующих КЛ, анализе их молекулярно-биологических параметров, изучении клинических особенностей и лекарственной чувствительности наследственного рака, поскольку возникает насущная потребность в системной оценке эффективности неoadьювантной цитотоксической терапии 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.

СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ

Основной задачей настоящего исследования является молекулярно-генетическая идентификация мутантных аллелей генов *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*, ассоциированных с РМЖ, на дооперационном этапе с последующим получением соответствующих КЛ, изучением их молекулярно-биологических параметров, клинических особенностей и лекарственной чувствительности. На сегодняшний день в онкологии появилась большая потребность в разработке системной оценки эффективности неoadьювантной цитотоксической терапии у носительниц наследственных мутаций по сравнению со случаями спорадического РМЖ. Данная работа имеет значимый клинический потенциал, поскольку среди российских женщин с наследственным РМЖ частота мутаций генов *CHEK2*, *NBS1*, *BLM* весьма высока, и в отношении этой категории больных до сих пор не сформулированы специфические терапевтические рекомендации. Полученные сведения позволят персонифицировать лечение, прогноз и подходы к медико-генетическому консультированию среди пациенток с данными категориями наследственного РМЖ.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основной целью исследования 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 неоадьювантного лечения.

2. Получить клеточные культуры *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных опухолей молочной железы, 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 неоадьювантное лечение.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Выявлены молекулярно-биологические параметры и клинические особенности наследственных форм рака молочной железы (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 рака молочной железы 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.

РЕАЛИЗАЦИЯ РАБОТЫ

Результаты настоящего исследования нашли отражение в научных работах (список прилагается), внедрены и используются в практической и научно-исследовательской работе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, кафедре онкологии ФГБОУ ВО «Северо-Западного государственного медицинского университета им. акад. И.И. Мечникова» Минздрава России.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было проведено ретроспективно-проспективное изучение молекулярно-генетических и клинико-биологических характеристик наследственных форм РМЖ и 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 (проспективные и ретроспективные) и контрольные группы. На каждом этапе исследования использовалось достаточное для получения статистически значимых результатов число пациенток, предусмотрены необходимые для обоснования полученных результатов контрольные группы больных.

На первом этапе с помощью аллель-специфической полимеразной цепной реакции был проведен молекулярно-генетический скрининг среди женщин с РМЖ с целью идентификации мутаций в генах-интереса. На втором этапе, полученный во время оперативного лечения пациенток, материал опухоли использовался для создания клеточных линий

наследственного РМЖ и их дальнейшей молекулярно-биологической характеристики с помощью методов иммуно-цитохимической диагностики. На выборке пациенток с *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированным РМЖ изучали молекулярно-генетические и клинические параметры наследственных карцином. Среди пациенток, получавших дооперационную лекарственную терапию, была оценена частота объективного 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 (T4);

Б. *NBS1*- и *BLM*-ассоциированные опухоли молочной железы существенно не отличаются от спорадических форм РМЖ по своим клинко-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 молочной железы 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.

ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

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 клинко-биологические характеристики СНЕК2-, 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 ОБЪЕМ 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.

Глава 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Роль генетических факторов в развитии рака молочной железы.

В настоящее время не вызывает сомнений ключевая роль генетических нарушений в полиэтиологическом процессе канцерогенеза или возникновения злокачественных новообразований. Согласно мутационной теории канцерогенеза, впервые сформулированной Т. Вовери и К.Н. Вауер еще в начале XX столетия, существует наследственная «склонность тканей образовывать опухоли при определенных внешних условиях». Эта склонность проявляется вследствие постепенного накопления в геноме разнообразных «соматических мутаций», которые возникают под воздействием многих физических, химических и биологических факторов среды и, как правило, становятся триггером неопластического процесса [Alberts B. et al., 2012; Горбунова В.Н. и соавт., 2015]. Мутации генов и/или аномалии кариотипа обнаруживаются в опухолевых тканях пациентов с онкологическими заболеваниями и в многочисленных культивируемых линиях трансформированных клеток.

Сегодня принято рассматривать канцерогенез как многоступенчатый процесс, включающий этапы инициации, промоции и опухолевой прогрессии. На всех его этапах в исходно нормальной единственной клетке происходит постепенное накопление генетических изменений, приводящее к нарушению ее биологических характеристик. При этом последовательно возникает сначала одна мутантная злокачественная клетка, затем - целый клон подобных клеток, из которого в последующем формируется клинически выявляемая опухоль, имеющая обычно моноклональное происхождение.

Многоступенчатость развития раковых заболеваний обусловлена прохождением нормальной клеткой нескольких последовательных

биохимических этапов, изменяющих клеточный гомеостаз и способствующих получению клеткой новых злокачественных свойств. Неопластическая трансформация может приводить более чем к ста разновидностям опухолевых новообразований различных органов и тканей, однако опухолевые клетки приобретают общие черты, к которым можно отнести уменьшение потребности в ФР, нечувствительность к антипролиферативным сигналам, нарушение запуска механизмов апоптоза, приобретение ангиогенной активности, способность к инвазивному росту и метастазированию, а также появление геномной нестабильности [Hanahan D., Weinberg R.A., 2000].

Изменение потребности в ФР может быть вызвано синтезом или усилением транспорта этих факторов в клетку, а также изменением их активности. Кроме того, к нарушению потребности в ФР могут приводить изменения свойств поверхностного аппарата клетки. Так, гиперэкспрессия рецепторов ФР (EGF-B/erbB, HER2/neu) увеличивает чувствительность клеток к пролиферативным сигналам [Yarden Y., Ullrich A., 1988].

Бесконтрольная пролиферация клеток связана с нарушением остановки клеточного цикла (КЦ) в «проверочных» (check-point) точках, что придает опухолевым клеткам возможность постоянно увеличиваться в размерах и делиться. Основным механизмом, при этом, является инактивация в пресинтетическом (G1) периоде КЦ белка Rb, высвобождающего транскрипционные факторы (например, E2F), необходимые для перехода в следующий - синтетический (S) период [Hanahan D., Weinberg R.A., 2000]. При этом, опухолевые клетки не подчиняются регуляторным сигналам о запуске механизмов апоптоза, что связано с нарушением синтеза апоптотических белков. Наиболее часто в опухолевых клетках наблюдается функциональная инактивация белка p53 - ключевого компонента ответа клетки на повреждение ДНК и запуска механизма клеточной гибели [Заридзе Д.Г., 2004].

Изменение адгезивных свойств поверхностного аппарата связано с изменением экспрессии клеточно-адгезивных молекул (семейство Е-кадгеринов) и приводит к нарушению формирования механических контактов между опухолевыми клетками. Трансформирующиеся клетки проявляют способность к ангиогенезу, что достигается выработкой ФР эндотелия (VEGF) и ФР фибробластов (FGF) [Hanahan D., Weinberg R.A., 2000]. Отдельные опухолевые клетки становятся способными секретировать протеазы, облегчающие их инвазивный рост или прорастание в окружающие ткани. Все эти приобретенные свойства обеспечивают опухолевым клеткам метастазирование и формирование вторичных опухолей в новых органах.

И наконец, трансформированные клетки характеризуются генетической нестабильностью, как на уровне отдельных генов, так и целых хромосом. Нестабильность генетического материала проявляется в возникновении одно- и двуниевых разрывов ДНК, появлении дополнительных копий ДНК, хромосомных aberrаций и анеуплоидий [Alberts B. et al., 2012; Горбунова В.Н. и соавт., 2015]. Способность к неограниченному размножению и генетическая нестабильность являются наиболее важными свойствами раковых клеток, что свидетельствует о тесной связи канцерогенеза с генетическим контролем стабильности генома и клеточных делений.

В развитие опухолей вовлекается огромное количество разнообразных генов, регулирующих механизмы клеточной пролиферации, репарации ДНК, стабильности хромосом, межклеточных взаимодействий, клеточного старения и апоптоза. Ключевую роль в возникновении и развитии трансформированных клеток играют гены контроля клеточного цикла (КЦ), условно подразделяемые на 2 семейства [Alberts B. et al., 2012; Заридзе Д.Г., 2004; Торопова Н.Е. и соавт., 2015]. Гены 1-го семейства обеспечивают стимуляцию клеточных делений; их нормальные аллели называют «протоонкогенами». Гены 2-го семейства подавляют клеточные деления; их нормальные аллели называют «антионкогенами» или «супрессорами опухолевого роста». Исследования последних лет позволили

идентифицировать продукты многих генов, которые контролируют сложные пути передачи сигнала и целые сигнальные каскады в клетках, регулируя клеточную пролиферацию, дифференцировку, апоптоз, репликацию и репарацию ДНК [Торопова Н.Е. и соавт., 2015] (Рисунок 1).

1. Протоонкогены.

К семейству протоонкогенов относятся гены сигнальной трансдукции, запускающие КЦ. Их продуктами являются белки - факторы роста (ФР), рецепторы ФР, G-белки, мембранные протеинкиназы (ПК) и транскрипционные факторы, которые, как правило, участвуют в позитивном контроле клеточного роста и деления. В настоящее время в геноме человека выявлено примерно 150 протоонкогенов (среди них HER2/neu, ER, PgR, EGFR, VEGFR, Vcl-2, гены семейства RAS, RAF и др.). Мутантные аллели этих генов называются "онкогены", они доминантны, и их действие может приводить к гиперактивности клеточных делений, вызванных либо производством аномального продукта с новой функцией, либо гиперэкспрессией этого продукта с агрессивными для клетки последствиями [Горбунова В.Н. и соавт., 2015; Alberts B. et al., 2012].

Оказалось, что основные семейства онкогенов связаны с рецепторно-сигнальной системой регуляции клеточного деления [Marchio C., Reis-Filho J.S., 2008] (Рисунок 2).

Семейство онкогенов *sis* кодирует белок, который по структуре близок к тромбоцитарному ФР. Его онкогенное действие связано с тем, что ФР образуется постоянно и в больших количествах, что стимулирует клеточные деления. Белки *sis* часто обнаруживается в опухолевых тканях при РМЖ и желудка.

Семейства онкогенов *erb* и *neu* кодируют дефектные рецепторы ФР эпидермиса. Эти рецепторы дают постоянный сигнал о клеточном делении, независимо от того, взаимодействует ли рецептор с ФР или нет.

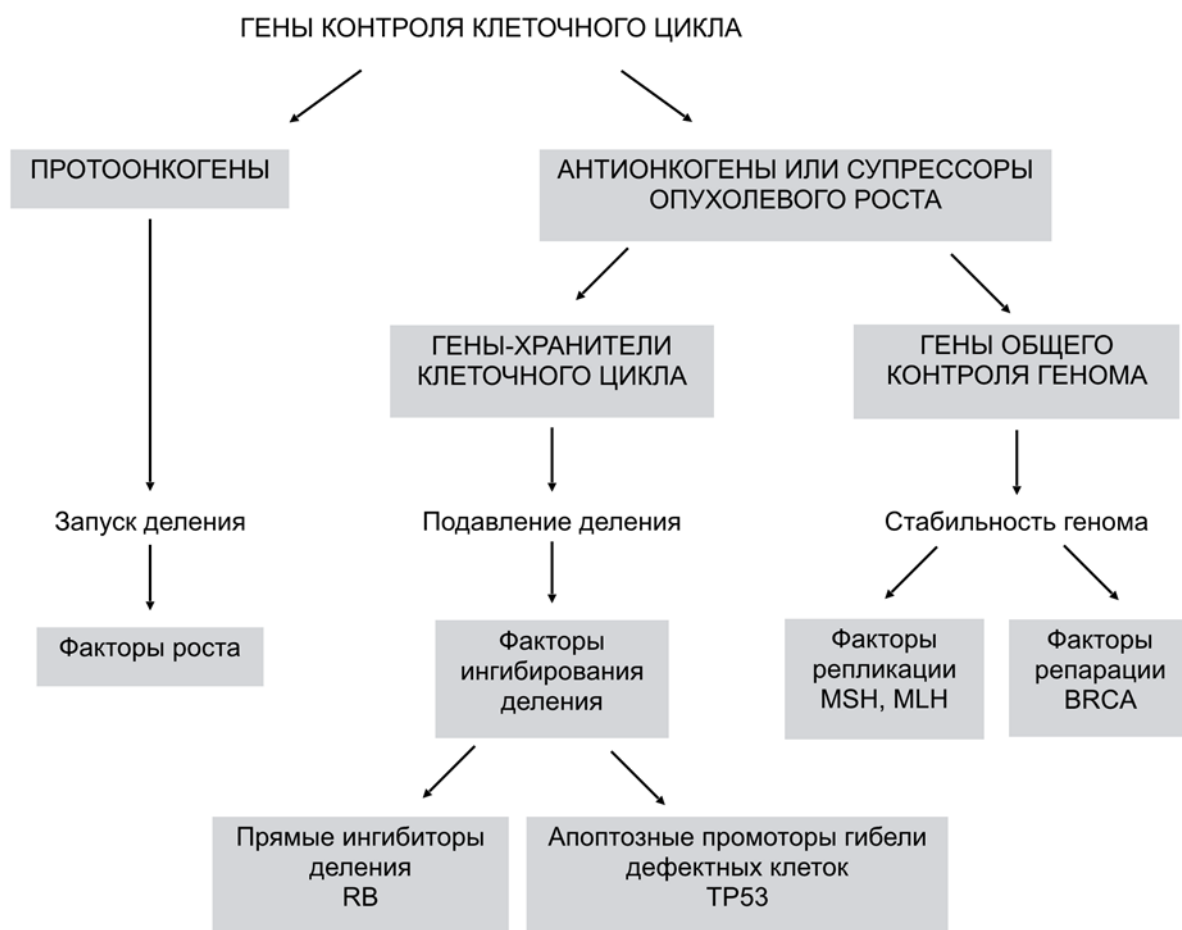


Рисунок 1. Генетический контроль клеточного цикла.

Амплификация гена *neu* наблюдается в 30% случаев при РМЖ и раке яичников, а также при множественной миеломе [Slamon D.J. et al., 1987, Yarden Y., Ullrich A., 1988].

Семейства онкогенов *ras* и *rab* кодируют ГТФ-связывающие белки (G-белки), отличающиеся от нормальных G-белков только одной аминокислотной заменой. Однако такая замена приводит к нарушению ГТФ-азной активности и к повышению концентрации внутриклеточных медиаторов ц-АМФ, ДАГ и И₃Ф, что делает клетку сверхчувствительной к ФР. Мутированные продукты семейства *ras* обнаруживаются в 90% случаев при раке поджелудочной железы и в 50% случаев при раке легких.

Семейства онкогенов *src*, *raf* и *yes* кодируют мембранные или цитоплазматические ПК, фосфорилирующие субстраты по тирозину. Они отличаются от нормальных ПК нерегулируемой активностью. Продукты этого семейства обнаруживаются в 100% случаев при кишечной карциноме, при доброкачественных и злокачественных полипах кишечника и при раке желудка.

Семейства *fos*, *myc* и *ski* кодируют транскрипционные факторы или ядерные белки, которые взаимодействуют с ДНК на уровне регуляторных последовательностей. Гиперэкспрессия этих продуктов обнаруживается в клетках опухолей мозга, яичника и при лейкемии.

Продукты мутантных протоонкогенов являются биологическими маркерами, определяемыми непосредственно в опухолевой ткани, они характеризуют индивидуальные особенности опухоли: склонность к инвазии, метастазированию, гормональную чувствительность и т.д. [Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., 2010]. Гиперэкспрессия онкогенов в опухолевых клетках часто достигается за счет амплификации или избирательного увеличения числа копий генов, что характерно, например, для генов белков-ФР и их рецепторов. Амплификация различных онкогенов в опухолевых клетках является важным прогностическим фактором развития рака, а также может изменить подход к лекарственной терапии опухолей определенных

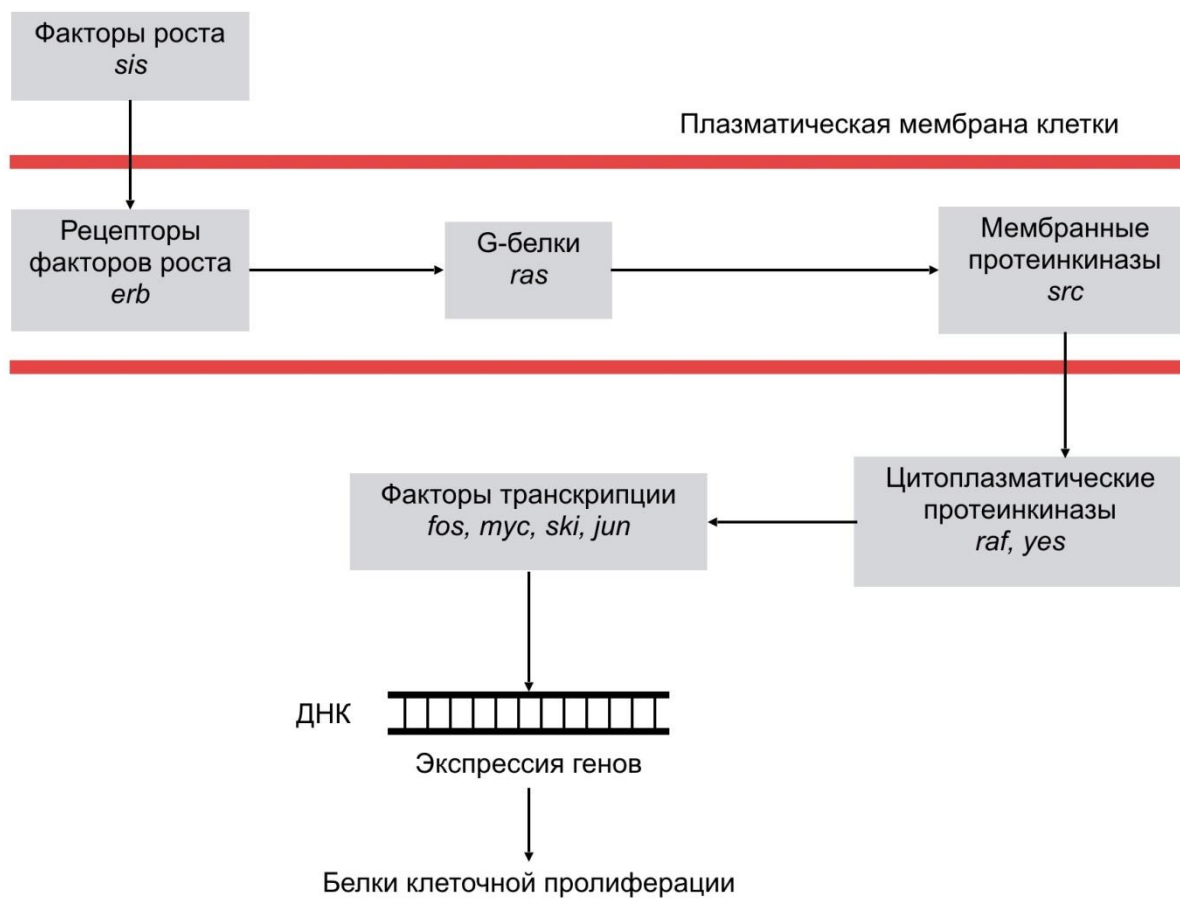


Рисунок 2. Рецепторно-сигнальный путь.

локализаций (Таблица 1) [Семиглазов В.Ф., 2015; Marchiò С, Reis-Filho J.S., 2008].

Таблица 1. Важность определения экспрессии онкогенов в диагностике и лечении РМЖ [Marchiò С, Reis-Filho J.S., 2008].

Ген	Частота экспрессии/амплификации	Клиническая значимость
<i>HER2</i>	До 30%	Ответ на лечение Трастузумабом в комбинации с химиотерапией
<i>ESR1</i>	Более 50%	Ответ на гормональную терапию
<i>EGFR</i>	1) 0,8 — 6% среди «случайных» пациентов с РМЖ; 2) 25% метапластического типа РМЖ; 3) 5 — 10% базального типа РМЖ	Возможный предиктивный маркер ответа при лечении ингибиторами тирозинкиназы
<i>TOP2A</i>	25 — 40% HER2-позитивного РМЖ	Ответ на лечение схемами химиотерапии, основанными на препаратах антрациклинового ряда
<i>FGFR1</i>	1) 8% среди «случайных» пациентов с РМЖ; 2) 10% ER-позитивный РМЖ	Возможный предиктивный маркер ответа при лечении ингибиторами тирозинкиназы

Первыми вошедшими в практику лечения пациентов с РМЖ показателями, относящимися к категории биологических маркеров, являются рецепторы стероидных гормонов (эстрогенов и прогестерона). Известно, что гормон-зависимые карциномы молочной железы имеют более благоприятное течение и обладают наибольшей чувствительностью к терапии, направленной против источника эстрогенов в организме [Переводчикова Н.И., Стенина М.Б. и соавт., 2010]. Так, например, усиление экспрессии генов рецепторов эстрогенов обнаруживается более, чем в половине всех случаев РМЖ. Рецепторы прогестерона (PgR) являются важным звеном реакции опухолевых клеток на прогестины и определяют их чувствительность к соответствующим препаратам. Кроме того, синтез рецепторов прогестерона индуцируется эстрогенами, которые связываются со своими рецепторами и запускают

экспрессию генов рецептора прогестерона. Поэтому наличие рецепторов прогестерона может свидетельствовать о функциональной активности рецепторов эстрогенов в опухолевых клетках молочной железы [Переводчикова Н.И., Стенина М.Б. и соавт., 2010].

Наиболее известным молекулярным маркером карцином молочной железы является тирозинкиназный рецептор HER2 к ФР, способный к самостоятельной передаче сигналов о делении клетки в ядро. Гиперэкспрессия этого рецептора и/или амплификация его гена в опухолевых клетках регистрируется в 15-25% случаев РМЖ. При этом рак характеризуется агрессивным течением, низкой выживаемостью и высокой частотой метастазирования во внутренние органы [Имянитов Е.Н., 2010].

Разрабатываемая на основе изучения молекулярного фенотипа опухолевых клеток индивидуальная терапия способствует улучшению прогноза самого онкологического заболевания и качества жизни у пациенток [Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., 2010; Семиглазов В.Ф., 2015]. На сегодняшний день известно более 100 потенциальных молекулярных мишеней для таргетной (биологически направленной) терапии РМЖ, важнейшими из которых являются рецепторы эстрогенов (ER) и семейство рецепторов эпидермального ФР (HER2) [Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., 2010; Имянитов Е.Н., 2010]. Так, например, назначение Трастузумаба (Герцептина) - первого инновационного таргетного препарата для лечения РМЖ - снижает риск рецидива опухоли и смерти у пациентов с РМЖ [Семиглазов В.Ф. и соавт., 2013; Семиглазов В.Ф., 2015; Тюляндин С.А. и соавт., 2010]. Экспрессия генов рецепторов эстрогенов является наилучшим предиктором положительного исхода лечения у пациенток, получающих Тамоксифен - препарат, способный оказывать антипролиферативное воздействие на опухолевые клетки молочной железы [Торопова Н.Е. и соавт., 2015; Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., 2011].

На сегодняшний день предложена иммуногистохимическая классификация РМЖ, основанная на оценке наличия рецепторов эстрогенов

(ER), прогестерона (PgR), гиперэкспрессии и/или амплификации ПК-рецептора (HER2) на поверхности опухолевых клеток [Cheang M.C.U. et al., 2009]. В соответствии с данной классификацией можно выделить основные молекулярно-биологические подтипы РМЖ:

1. ER-позитивный, который характеризуется экспрессией рецепторов стероидных гормонов (ER+/PgR>20%), в некоторых случаях может наблюдаться сверхэкспрессия или амплификация ПК-рецепторов (HER2+);

2. HER2-позитивный, который характеризуется сверхэкспрессией или амплификацией ПК-рецепторов, рецепторы стероидных гормонов отсутствуют (ER-/PgR-/HER2+);

3. «Трижды негативный», при котором отсутствует экспрессия рецепторов стероидных гормонов и ПК-рецепторов (ER-/PgR-/HER2-).

С учетом значимых отличий в течении заболевания, а также чувствительности к проводимой лекарственной терапии, предложенная классификация имеет важную практическую значимость, так как позволяет изменить подход к планированию проводимой терапии [Harbeck N. et al., 2013].

2. Антионкогены.

Гены второго семейства - антионкогены или супрессоры опухолевого роста - включают в себя 2 группы [Заридзе Д.Г., 2004]. Первая - "gatekeepers" - «гены-хранители клеточного цикла» (ГХКЦ - гены *TP53*, *Rb*, *p16INK4a*, *pARF* и др.), контролирующие апоптоз и КЦ и обеспечивающие запрет на пролиферацию клеток с различными генетическими мутациями. Продуктами ГХКЦ могут быть белки-факторы ингибирования деления, которые представляют собой негативные регуляторы клеточного роста, то есть подавляющие клеточные деления, и, следовательно, в норме обладающие противоопухолевым эффектом. Кроме того, эти гены контролируют апоптоз и

прохождение клетки через все стадии КЦ, включая «рестрикционные» или проверочные (check-point) точки повреждений в молекуле ДНК.

Апоптоз относится к наиболее эффективным механизмам поддержания генетической стабильности клетки, избирательно уничтожая клетки с поврежденной ДНК [Чумаков П.М., 2007; Майборода А.А., 2013]. Около 50-75% спорадических форм рака имеют молекулярные дефекты в гене *TP53*. Герминальные мутации гена *TP53* являются генетической основой синдрома Ли-Фраумени, (Li-Fraumeni syndrome), симптомокомплекс которого включает РМЖ у молодых женщин и злокачественные новообразования других локализаций (мягкотканые саркомы, остеосаркомы, опухоли головного мозга, лейкозы, рак коры надпочечников) [Любченко Л.Н. и соавт., 2013].

Вторая группа генов - "caretakers" или «гены-смотрители стабильности генома» (ГСГ - гены *MSH*, *MLH*, *BRCA1/2*, *CHEK1/2*, *ATM*, *ATR* и др.), которые контролируют проведение сигнала от поврежденной ДНК к каким-либо эффекторным белкам, запускающим механизмы репарации. ГСГ обеспечивают целостность генов и хромосом и поддерживают стабильность генетического материала при клеточном делении.

Наиболее важными репаративными белками считаются сходные по структуре и функции ПК АТМ (Ataxia-Telangiectasia Mutated) и АТР (ATM Related), запускающие последовательный каскад фосфорилирования эффекторных белков - продуктов генов *CHEK 1/2*, *TP53*, *BRCA1/2*, что вызывает остановку КЦ и направление клетки либо по пути репарации ДНК, либо по пути апоптоза [Чумаков П.М., 2007]. Опухолевый супрессор *BRCA1* способен связывать рецептор эстрогенов, сдерживая избыточную пролиферацию клеток молочной железы и других эстроген-зависимых органов. Инактивация гена *BRCA1* объясняет, очевидно, возникновение опухолей именно молочной железы и яичников.

Мутантные аллели семейства антионкогенов также называются «онкогены», они рецессивны; их возникновение приводит к гиперактивации митотических делений и нарушениям механизмов апоптоза, процессов

репарации и репликации ДНК. Дефектными продуктами этих онкогенов являются ферменты репарации, не способные восстановить повреждения ДНК. При этом, накопление нерепарируемых повреждений ДНК приводит к хромосомным разрывам и перестройкам, и, следовательно, к нарушениям стабильности клеточного генома. В случае отмены апоптоза для таких генетически поврежденных клеток резко увеличивается вероятность их размножения, что и приводит к трансформирующему эффекту. Поэтому очевидно, что онкогенный потенциал мутаций генов *TP53*, *MSH*, *MLH*, *BRCA1/2*, *CHEK1/2*, *ATM*, *ATR* и других генов связан с нарушениями реакций клетки на повреждения ДНК, с возникающей при этом генетической нестабильностью [Bartkova J. et al., 2008].

3. Роль продуктов антионкогенов при прохождении клеточного цикла.

Все белки, участвующие в поддержании генетической стабильности клетки, функционально подразделяются на: сенсорные, трансдукторные и эффекторные. К сенсорным белкам, сигнализирующим о повреждениях ДНК, относятся белки так называемого MRN-комплекса (белки Mre11, Rad50, NBS1). Трансдукторные белки получают сигналы о повреждении ДНК от сенсорных белков и регулируют работу белков-эффекторов. К ним относятся белки ATM, ATR, CHEK1/2. Эффекторные белки обеспечивают остановку КЦ, запускают репарацию ДНК и апоптоз. К ним относятся белки p53, BRCA1/2, PNCА, MSH, MLH, PTEN, различные каспазы [Bartkova J. et al., 2008].

Важную роль в интеграции сигналов от поврежденной ДНК и их дальнейшей передаче к разнообразным эффекторным белкам в клетке играют специфические протеинкиназы ATM (Ataxia-Teleangiectasia Mutated), ATR (ATM Related), NBS1, CHEK1 и CHEK2 (чекпойнт-киназы 1 и 2) (Рисунок 3).

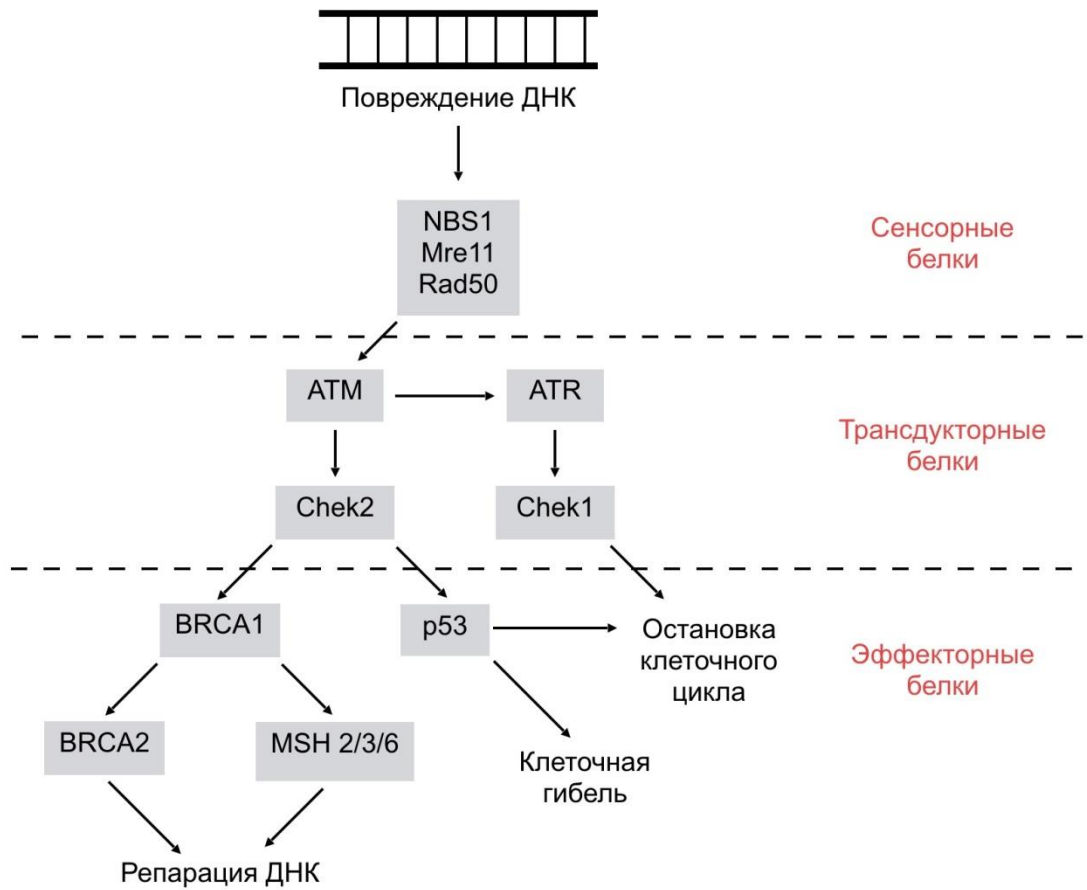


Рисунок 3. Сигнальные пути, регулирующие реакции клетки на повреждение ДНК [Bartkova J. et al., 2008].

Белок АТМ накапливается в местах повреждений ДНК и приобретает ПК активность, связывая сенсорные белки, улавливающие повреждения структуры ДНК. При этом белок АТМ активируется в ответ на возникновение двунитевых разрывов в молекуле ДНК (вследствие воздействия гамма-облучения, ингибиторов топоизомераз и т.д.), тогда как другие нарушения структуры ДНК (например, сшивки оснований, вызываемые УФ-облучением, или повреждения, индуцируемые алкилирующими соединениями) не активируют белок АТМ. В этих случаях, как и при ингибировании синтеза ДНК, наблюдается функциональная активация белка АТР, являющегося гомологом белка АТМ.

Активированные формы молекул АТМ и АТР каскадно фосфорилируют ряд своих мишеней, в частности белки p53, NBS1 (нибрин), СНЕК1/2 (чекпойнт-киназы) и ВРСА1/2. Для фосфорилирования белка СНЕК2 необходимо предварительное фосфорилирование белков комплекса MRN, который, локализуясь в местах повреждений ДНК, привлекает к ним различные молекулы, в том числе СНЕК2, ВРСА1, E2F и PCNA [Заридзе Д.Г., 2004, Bartkova J. et al., 2008]. Привлечение PCNA - вспомогательного фактора репарационной ДНК-полимеразы - вызывает переключение репликативного синтеза ДНК на репарационный и остановку КЦ в S периоде. Чекпойнт-киназы СНЕК1/2, в свою очередь, фосфорилируют и инактивируют белки-циклины, что вызывает подавление активности регулируемых ими циклинзависимых ПК и быструю остановку КЦ в G1 или G2 периоде. Кроме того, протеинкиназы СНЕК1/2 посылают сигналы к белкам p53 и ВРСА1, что активизирует системы репарации ДНК во время остановки КЦ.

Оказалось, что у части пациентов с клиническими проявлениями синдрома Ли-Фраумени, не имеющих мутаций в гене *TP53*, выявляют другие мутации с потерей функции (loss of function) в гене *CHEK2*. Поэтому сигнальный путь СНЕК2-p53 имеет ключевую роль в контроле реакции клетки на повреждения молекулы ДНК. Нарушение этого сигнального пути обуславливает значимую предрасположенность к развитию новообразований

различных локализаций. Соматические инактивирующие мутации чекпойнт-киназ СНЕК1/2 обнаруживаются в части случаев наиболее распространенных опухолей: рак легкого, рак толстого кишечника, рак матки и др. [Заридзе Д.Г., 2004].

4. «Двухударная» модель развития рака.

Процесс возникновения злокачественных опухолей можно рассматривать как генетическое заболевание, развивающееся в результате множества мутаций, возникающих либо спорадически в соматических клетках, либо наследуемых от родителей. В 1971 году Альфред Кнудсен сформулировал «двухударную» теорию развития опухолей, согласно которой одна соматическая мутация гена-супрессора опухолевого роста в клетке только повышает риск ее трансформации в раковую, а мутационное повреждение второго аллеля того же гена приведет к безостановочному росту клетки и образованию опухоли [Knudson A. et al., 1971; Knudson A. et al., 2001]. Другими словами, спорадическое возникновение опухоли требует 2-х независимых мутационных событий в ГХКЦ ($AA \rightarrow Aa \rightarrow aa \rightarrow \text{опухоль}$) (Рисунок 4) [Alberts B. et al., 2012].

При наследственных формах опухолей одна герминальная мутация наследуется пациентом от родителей, но для злокачественной трансформации клетки необходимо только 1 мутационное событие во втором аллеле того же гена ($Aa \rightarrow aa \rightarrow \text{опухоль}$). Такое явление получило название «потеря гетерозиготности» (loss of heterozygosity) [Майборода А.А., 2013; Соколенко А.П. и соавт., 2016]. Инактивация второго гомологичного аллеля, как правило, достигается либо за счет мутаций, либо эпигенетических модификаций соответствующего гена-супрессора опухолевого роста [Alberts B. et al., 2012]. Если же спонтанное мутационное событие затрагивает ГСГ, то повышается вероятность мутирования ГХКЦ за счет нарушения работы системы репарации, а накопление мутаций в других ГСГ приведет к

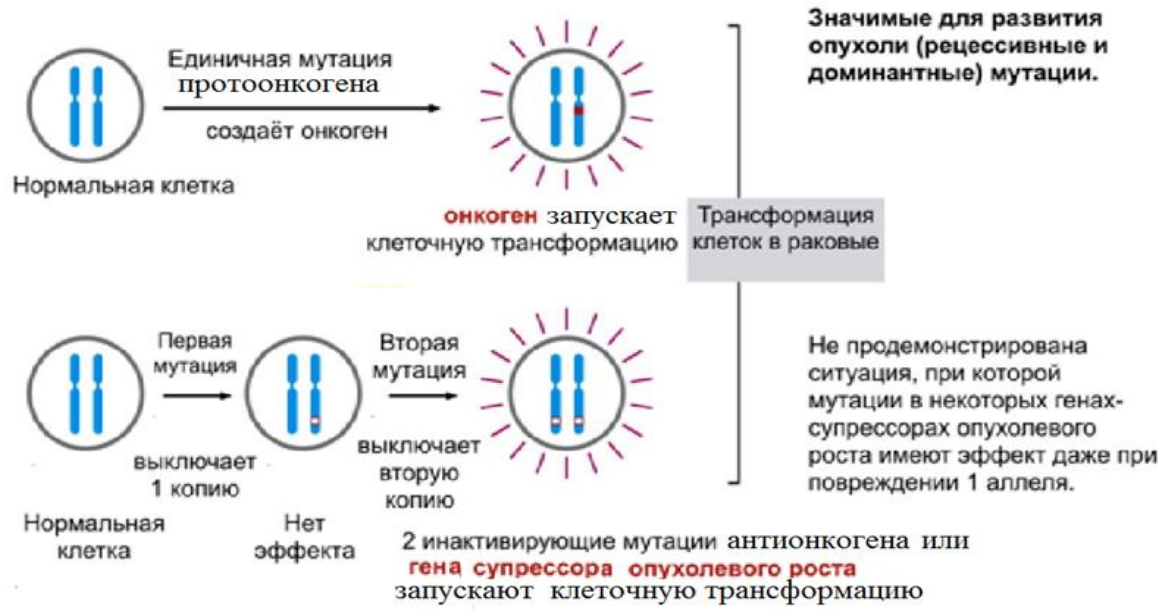


Рисунок 4. Варианты мутаций в протоонкогенах и антионкогенах
[Alberts B. et al., 2012].

быстрому росту опухоли. При наследовании одной мутации ГСГ от родителей для развития опухоли будут необходимы 3 независимых мутационных события: вторая мутация ГСГ и две мутации ГХКЦ ($AaBV \rightarrow aaBV \rightarrow aaVv \rightarrow aavv \rightarrow \text{опухоль}$). При этом, риск развития опухоли для носителя мутации ГСГ окажется на порядок ниже, чем у носителя мутации ГХКЦ.

Следует заметить, что многие белки-опухолевые супрессоры кодируются генами, нарушение функции которых увеличивает темп мутирования, в том числе в онкогенах. Действительно, врожденные мутации даже в одном из аллелей генов опухолевых супрессоров делают более вероятным возникновение определенных форм новообразований: сарком, лейкозов, опухолей мозга или РМЖ и рака яичников.

В настоящее время, можно с уверенностью утверждать, что генетические нарушения в работе антионкогенов, участвующих в контроле клеточного цикла и в репарации ДНК, являются ведущими в этиологии подавляющего большинства злокачественных новообразований человека. Для возникновения трансформированного клеточного клона необходимо как минимум 5-10 и более мутаций в разных прото- и антионкогенах. Учитывая скорость мутационных процессов, подобное накопление мутаций в одной и той же клетке представляется событием маловероятным. Очевидно, что на каком-то из промежуточных этапов трансформации клон опухолевых клеток приобретает «мутаторный фенотип» или способность к ускоренному мутагенезу за счет повышенной частоты возникновения спонтанных соматических мутаций.

Наследственный рак молочной железы.

РМЖ на сегодняшний день является одним из самых частых онкологических заболеваний, диагностируемым у женщин во всем мире

[Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В., 2017]. Ежегодно в мире регистрируется около 1,7 млн. новых случаев РМЖ [Любченко Л.Н., Батенева Е.И., 2014]. Заболевание поражает женщин всех возрастов, рас, национальностей, социально-экономических слоев и географических районов [Чиссов В.И., 2010]. Встречаемость РМЖ сильно варьирует в разных странах: наиболее высокая частота наблюдается среди жителей Северной Америки и Западной Европы. Среди женщин Японии и Китая РМЖ встречается примерно в 8 раз реже. [Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В., 2010; Turnpenny P., Ellard S., 2009]. РМЖ представляет собой важную медицинскую проблему не только в связи с высокой заболеваемостью, но и высокой смертностью среди женского населения [Любченко Л.Н., Батенева Е.И., 2014]. В 2012 году в Российской Федерации около 30% новых случаев онкологических заболеваний среди женщин пришлось на рак молочной железы. При этом пик заболеваемости наблюдался в возрасте от 50 до 65 лет [GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide].

Среди всех онкологических заболеваний РМЖ относится к одним из самых частых разновидностей семейных форм рака. От 5 до 10% случаев РМЖ являются наследственными [Имянитов Е.Н., 2010; Любченко Л.Н., Батенева Е.И., 2014; Lalwani N. et al., 2011].

1. Семейные формы рака.

В 1866 году Р. Вроса стал первым автором, который описал семью с высокой частотой карцином молочной железы. Его супруга страдала РМЖ в молодом возрасте, и когда он составил родословную её семьи, то обнаружил, что опухоли молочной железы встречались у ее родственников в четырёх поколениях. Его доклад был первым из многих, указавших на то, что РМЖ может быть наследственным и передаваться из поколения в поколение [Groer P. et al., 2011]. Возможность существования наследственных форм рака также предположил А. Warthin в 1913 году. Он описал 4 семьи, в которых рак

желудка наблюдался в пяти поколениях, и впервые ввел специальный термин для таких случаев - "раковая семья". В 1960-1990-х годах был осуществлен целый ряд исследований, приведших к уточнению роли наследственных факторов в происхождении злокачественных новообразований и к идентификации конкретных генетических событий, ответственных за возникновение семейных форм рака разных локализаций.

На основе анализа данных литературы о детских эмбриональных новообразованиях авторы пришли к выводу, что опухоли одной и той же локализации могут быть наследственными и ненаследственными (спорадическими), поскольку первоначальная мутация может произойти как в половой (герминальной), так и в соматической клетке. При этом в случае ненаследственной (спорадической) формы рака оба мутационных события должны произойти в одной соматической клетке. При наследственном раке одно из генетических повреждений (герминальная мутация) с большой вероятностью может быть унаследовано от одного из родителей и присутствует во всех соматических клетках у потомков [Knudson A. et al., 1971; Knudson A. et al., 2001].

2. Характер наследования рака молочной железы.

Наследственные опухолевые синдромы составляют незначительную долю от общего числа новообразований (около 1%), хотя для отдельных локализаций (молочная железа, яичник, толстая кишка) их удельный вклад достигает до 20%. Изучение семей с РМЖ показало, что у женщин, имеющих родственников I-ой степени родства с РМЖ, риск развития новообразований оказывается намного выше популяционного для данной локализации опухоли [Имянитов Е.Н., 2010].

Причиной увеличения риска развития РМЖ является носительство наследуемых (онкоассоциированных) мутаций в кандидатных генах [Имянитов Е.Н., 2011]. Наследственная предрасположенность к раку

передается как обычный менделевский доминантный признак с разной степенью пенетрантности и манифестацией в более раннем возрасте, чем спорадические формы рака (Рисунок 5) [Turnpenny P., Ellard S., 2009; Имянитов Е.Н., 2011; Nolan E. et al., 2017]. Это означает, что все родственники I-ой степени родства имеют 50%-й шанс унаследовать мутацию, которая предрасполагает к повышенному риску опухоли. При этом передача мутации в семье возможна как по материнской, так и по отцовской линиям.

К основным клиническим признакам наследственного характера РМЖ относятся: (1) наличие в семье двух и более поражённых РМЖ/РЯ родственников I/II-ой степени родства; (2) молодой возраст пациенток (до 50 лет) ко времени возникновения опухоли; (3) первично-множественное поражение молочной железы и яичников, двустороннее поражение парных органов; (4) для РМЖ, ассоциированного с мутациями в гене *BRCA1* - «трижды-негативный» молекулярный подтип рака (ER-/PgR-/HER2-) [Имянитов Е.Н., Хансон К.П., 2007; Имянитов Е.Н., 2010; Соколенко А.П. и соавт., 2016]. Следует отметить, что не все особенности наследственного РМЖ могут встречаться одновременно. Возможны большие вариации в их проявлении даже среди членов одной семьи [Любченко Л.Н., Батенева Е.И., 2014].

1. BRCA-ассоциированный рак молочной железы.

Одним из достижений молекулярной генетики явилось открытие и картирование генов, ответственных за наследственную предрасположенность к РМЖ. Исследования семей с признаками наследственного РМЖ в середине 1990х годов привели к идентификации двух ассоциированных с этим заболеванием генов - *BRCA1* (OMIM#113705) и *BRCA2* (OMIM#600185) [Miki et al., 1994; Wooster et al., 1994].

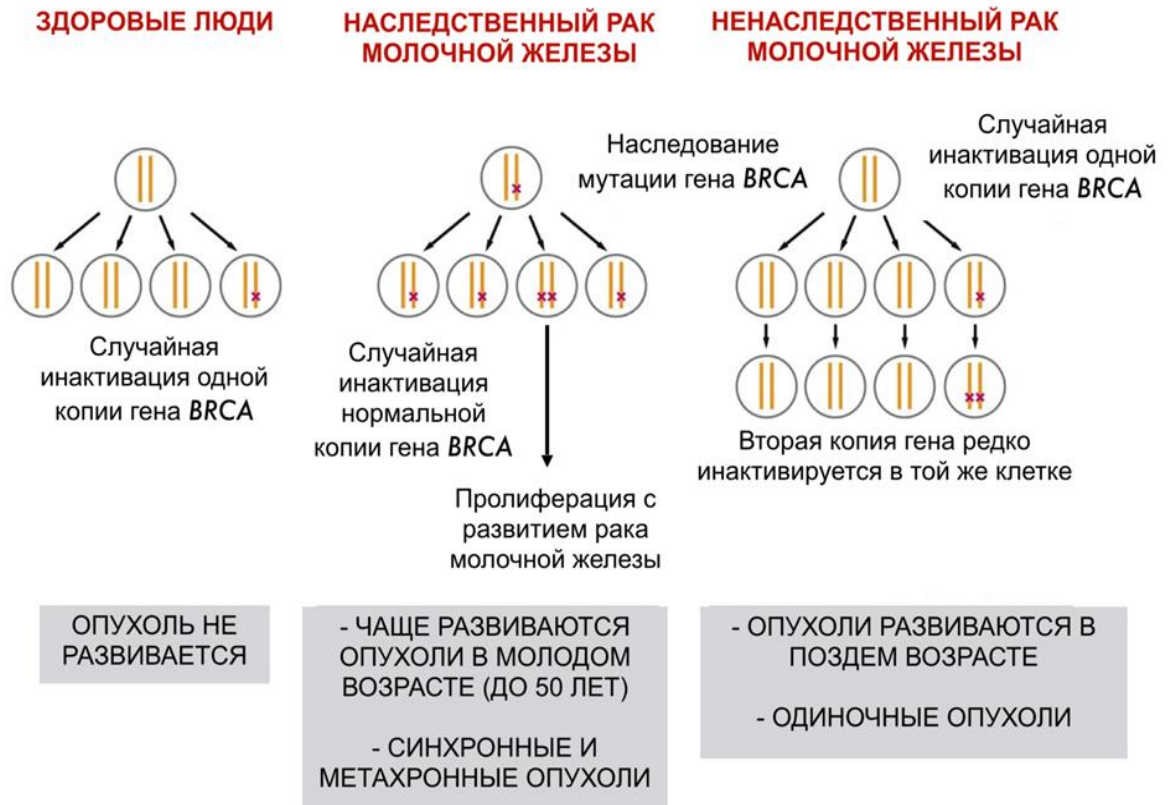


Рисунок 5. Наследственный и ненаследственный рак [Alberts B. et al., 2012].

Мутации в этих генах обладают высокой пенетрантностью, они характерны для наследственных форм рака и значительно реже обнаруживаются при спорадических опухолях той же локализации [Заридзе Д.Г., 2004]. Мутации в генах *BRCA1/2* обуславливают 20-50% наследственных форм РМЖ и до 90-95% наследственного рака яичников (РЯ) у женщин, а также до 40% РМЖ у мужчин [Narod S., Foulkes W., 2004; Ferla R. et al., 2007; Любченко Л.Н., Батенева Е.И., 2014]. Помимо РМЖ, у носителей мутаций в генах *BRCA1/2* может развиваться рак фаллопиевых труб, рак желудка, рак простаты и рак поджелудочной железы [14]. Риск РМЖ у мужчин-носителей, рака простаты и рака поджелудочной железы в большей степени увеличен при наличии генетических повреждений в гене *BRCA2* [Соколенко А.П. соавт., 2016; Groep P. et al., 2011].

Женщины-носительницы высокопенетрантных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* обладают «фатально» увеличенным риском развития карцином молочной железы и яичников [Имянитов Е.Н., 2010]. Среди таких женщин риск развития РМЖ до 70 лет составляет 60-70%, а риск развития РЯ - до 40%. Риск развития повторной опухоли у носительниц *BRCA*-мутаций намного выше (более 50%), чем у неносителей, в частности, при выявлении РМЖ в молодом возрасте [Pal T., Vadaparampil S.T., 2012]. Кроме того, риск возникновения РМЖ у носительниц мутаций в генах *BRCA1/2* увеличивается с возрастом (Таблица 2) [Julie B.C. et al., 2001].

Молекулярно-генетические характеристики опухолевых клеток РМЖ, ассоциированного с мутациями в генах *BRCA1/2*, имеют особенности по сравнению со спорадическими формами рака. В них часто обнаруживаются дополнительные мутации антионкогена TP53, приводящие к проявлению высокой степени злокачественности опухолевых клеток, что соответствует, так называемому, «трижды негативному» подтипу РМЖ. На поверхности опухолевых клеток при таком молекулярном подтипе РМЖ не экспрессируются рецепторы к эстрогенам (ER), прогестерону (PgR) и тирозин-киназные рецепторы (HER2) [Liedtke C. et al., 2013]. *BRCA2*-

ассоциированные опухоли по молекулярным характеристикам сходны со спорадическим РМЖ (Таблица 3) [Narod S.A., Foulkes W.D., 2004].

Таблица 2. Кумулятивный риск развития РМЖ у женщин-носительниц мутаций в генах *BRCA1/2* в зависимости от их возраста [Julie B.C. et al., 2001].

Возраст	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
30 лет	3,2%	4,6%
40 лет	19,1%	12%
50 лет	50,8%	46%
60 лет	54,2%	61%
70 лет	85%	86%

Уточнение молекулярно-генетических и патогенетических характеристик *BRCA*-позитивного РМЖ позволяет ближе подойти к индивидуализации системной терапии у пациенток и, в ряде случаев, отказаться от заведомо неэффективного, токсичного и дорогостоящего лечения [Семиглазов В.Ф. и соавт., 2013].

Таблица 3. Молекулярно-генетические характеристики *BRCA1/2*-ассоциированных карцином МЖ [Narod S.A., Foulkes W.D., 2004].

Фенотип	<i>BRCA1</i> -ассоциированный рак	<i>BRCA2</i> -ассоциированный рак
Морфология	Протоковый рак; атипичные медуллярные карциномы (около 10%)	Протоковый рак; атипичные медуллярные карциномы (до 5%)
Экспрессия рецептора эстрогенов	Негативная (75%)	Позитивная (75%)
Экспрессия HER2	Негативная (95%)	Негативная (95%)
Экспрессия p53	Позитивная (50%)	Позитивная (40%)
Экспрессия циклина D1	Негативная (90%)	Позитивная (60%)
Рак <i>in situ</i>	Редко	Часто

3. Другие гены, ассоциированные с наследственным раком молочной железы.

С мутациями в генах *BRCA1/2* связано большинство, однако, не все случаи наследственного РМЖ. На рисунке 6 изображены некоторые известные гены наследственного РМЖ и их предположительный вклад в развитие семейных форм РМЖ [Groep P. et al., 2011].

Изучение *BRCA*-негативного семейного РМЖ привело к идентификации новых, связанных с этим заболеванием генов: *CHEK2*, *PALB2*, *NBS1*, *PTEN*, *ATM*, *TP53*, *BARD1*, *BLM* и др. [Groep P. et al., 2011]. Многие из них входят в специализированную систему распознавания и репарации повреждений ДНК, дефекты которой вызывает генетическую нестабильность, предопределяющую развитие новообразований. Гены *ATM*, *CHEK2*, *NBS1*, *TP53* активируют, в свою очередь, белковые молекулы, ответственные за остановку КЦ и индукцию апоптоза, регулируя таким образом пролиферацию клеток.

Однако, пенетрантность мутаций таких генов, предрасполагающих к развитию наследственных форм рака, может сильно варьировать, даже если они принимают участие в одном и том же молекулярном процессе в клетке (Таблица 4) [Marchiò C, Reis-Filho J.S., 2008; Ergul E., Sazci A., 2001; Groep P. et al., 2011].

На долю умеренно пенетрантных мутаций в генах *CHEK2*, *ATM*, *BARD1*, *BLM*, *NBS1*, *RAD50* приходится до 5-10% всех случаев наследственного РМЖ [Mavaddat N. et al., 2010; Shuen A.Y. et al., 2011; Antoniou A.C. et al., 2014; John M.S. et al., 2016; Mina A., Mina L.A., 2016; Lalloo F., Yarbrow C.H., Wujcik D., Gobel B.H., 2018]. Мутации в этих генах повышают риск РМЖ в 1,5-5 раз [Meindl A. et al., 2011]. Так как риск развития рака, ассоциированного с мутациями в этих генах, относительно невелик, а клинико-биологические свойства таких карцином недостаточно изучены, рекомендации по ранней диагностике, лечению и профилактике для данных категорий

наследственного рака на сегодняшний день не разработаны [Соколенко А.П. и соавт., 2016].

Таблица 4. Величина риска РМЖ в случае гетерозиготных мутаций в кандидатных антионкогенах [Marchiò C, Reis-Filho J.S., 2008; Ergul E., Sazci A., 2001; Groep P. et al., 2011].

Ген	Локус	Функция	Риск
<i>BRCA1</i>	17q21	Репарация двунитевых разрывов ДНК; трансактивация апоптоза и контроль КЦ; угнетает транскрипционную функцию рецептора эстрогенов	Высокий
<i>BRCA2</i>	13q12	Репарация двунитевых разрывов ДНК; регуляция транскрипции	Высокий
<i>TP53</i>	17p13.1	Транскрипционный фактор; работает в ответ на повреждение ДНК и клеточный стресс; регуляция апоптоза	Высокий
<i>ATM</i>	11q22	Репарация двунитевых разрывов ДНК; активация p53, BRCA1, Chk2, NBS1	Промежуточный
<i>PTEN</i>	10q23	Контроль роста и пролиферации клеток	Промежуточный
<i>CHEK2</i>	22q12.1	Чекпоинткиназа; остановка КЦ; активация p53	Промежуточный
<i>NBS1</i>	8q21	Репарация двунитевых разрывов ДНК; остановка КЦ	Промежуточный
<i>MSH, MLH</i>	-	Репарация неспаренных нуклеотидов («mismatch»)	Низкий

Наследственный РМЖ может встречаться в сочетании с новообразованиями других органов при некоторых редких генетических синдромах, характеризующихся повышенной предрасположенностью к развитию широкого спектра опухолей. Данная группа заболеваний обусловлена высоко пенетрантными мутациями в генах *PTEN*, *TP53*, *STK11*, *CDH1* (Таблица 5) [Соколенко А.П. и соавт., 2016; Marchiò C., Reis-Filho J., 2008]. Мутации в этих генах повышают риск РМЖ в 5-20 раз [Meindl A. et al., 2011].

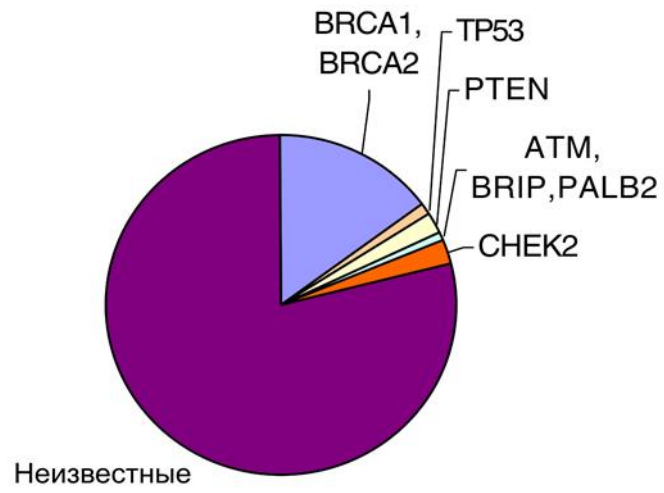


Рисунок 6. Гены наследственного РМЖ [Groer P. et al., 2011].

Несмотря на большой прогресс в изучении семейных форм РМЖ, генетические причины существенной части наследственных опухолей данной локализации рака до сих пор остаются неизвестными (Рисунок 6) [Marchiò С, Reis-Filho J.S., 2008].

Таблица 5. Наследственные синдромы, ассоциированные с высокопенетрантными мутациями кандидатных генов РМЖ [Marchiò С., Reis-Filho J.S., 2008].

Ген (локус)	Синдром (ОМIM#)	Риск новообразования в случае гетерозиготного носительства мутации
<i>CDH1</i> (16q22.1)	Синдром семейного рака желудка и лобулярного РМЖ (192090)	Рак желудка: высокий риск Дольковый РМЖ: умеренное увеличение риска
<i>TP53</i> (17p13.1)	Синдром Ли-Фраумени (151623)	Высокая частота развития РМЖ в молодом возрасте, саркомы, остеосаркомы, опухоли мозга, лейкемия, адренокортикальные карциномы
<i>PTEN</i> (10q23.31)	Синдром Коудена (158350)	Высокий риск развития рака различных локализаций (РМЖ, рак щитовидной железы, рак эндометрия и другие)
<i>PTEN</i> (10q23.31)	Синдром Баньяна-Рилей-Ривалькаба (153480)	Высокий риск развития РМЖ, менингеомы, фолликулярных опухолей щитовидной железы
<i>STK1</i> (19p13.3)	Синдром Пейтц-Егерса (175200)	Повышенный риск развития новообразований различных локализаций (РМЖ, рак поджелудочной железы, рак шейки матки)

4. Распространенность мутаций в генах наследственного рака молочной железы в России.

Встречаемость мутаций в генах наследственного РМЖ различается у жителей разных стран и представителей различных этнических групп. Специфические мутации были зарегистрированы среди евреев Ашкенази, жителей Исландии, Нидерландов, Швеции, Норвегии, Германии, Испании,

Франции, Канады и стран юго-восточной Европы [Balmaña J. et al. ESMO Clinical Practice Guidelines, 2010; Имянитов Е.Н., 2010]. Подобное географическое распределение мутаций имеет важное практическое значение, так как присутствие в популяции ограниченного числа мутаций наследственного РМЖ значительно упрощает подходы к молекулярно-генетической диагностике [Соколенко А.П. и соавт., 2016].

Интересной особенностью российских пациенток с наследственным РМЖ является относительно высокая частота встречаемости мутаций в генах *BRCA1*, *CHEK2*, *NBS1*, *BLM* (Таблица 6), и низкая встречаемость мутаций в гене *BRCA2* [Имянитов Е.Н., 2010]. В отличие от мутаций в генах *BRCA1/2*, мутации в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* обладают заметно меньшей пенетрантностью [Соколенко А.П. и соавт., 2016].

Таблица 6. Встречаемость мутаций генов наследственного РМЖ в России [Имянитов Е.Н., 2010; Соколенко А.П. и соавт., 2016].

Ген	Мажорные мутации	Здоровые люди	Пациенты с клиническими признаками наследственного рака	"Случайные" больные РМЖ
<i>BRCA1</i>	5382insC, 4153delA, 185delAG	~0,1%	~10%	2-4%
<i>CHEK2</i>	1100delC, IVS2+1G>A, 5395del	<1%	~5%	~2%
<i>NBS1</i>	657del5	0,5%	~1%	0,7%
<i>BLM</i>	Q548X	0,3%	~1,5%	~1%

Изучение семей с наследственным РМЖ в Европе наряду с мутациями в генах *BRCA1/2* показало, что носительство мутаций в гене *CHEK2* (OMIM#604373) достаточно часто наблюдается в Финляндии, Нидерландах, Польше и некоторых других странах [*CHEK2* Breast Cancer Case-Control Consortium, 2004; Gorski et al., 2005]. Так, наиболее часто встречающаяся

аллель гена *CHEK2* 1100delC обнаруживается у 2% пациенток с РМЖ в Европейских странах и у 1,4% здоровых женщин. Значительно чаще этот мутантный аллель встречается у пациенток с позитивным семейным анамнезом РМЖ (3,1%), в случаях *BRCA1/2*-негативного РМЖ без семейного анамнеза наследственного рака (5,5%), а также среди пациенток, имеющих пораженных родственников I-ой степени родства (6,2%). Кроме того, пациенты с билатеральными опухолями молочной железы имеют шестикратно увеличенный риск носительства мутации *CHEK2* 1100delC [Vahteristo P. et al., 2002].

В России обнаруживаются 3 «мажорные» мутации в гене *CHEK2* (1100delC, IVS2+1G>A, 5395del), которые ответственны за развитие 3-4% случаев РМЖ [Chekmariova et al., 2006; Соколенко А.П. и соавт., 2008]. В клетке все три типа мажорных мутаций приводят к сдвигу рамки считывания, преждевременной остановке трансляции и образованию укороченного и функционально неактивного белка (Таблица 7) [Navranek O. et al., 2015; Jiri V., Jiri L., 2003; Dong X. et al., 2003].

Инактивация одного из двух аллелей гена *CHEK2* сопровождается промежуточным повышением риска РМЖ [Соколенко А.П. и соавт., 2016]. Однако в отличие от мутаций генов *BRCA1/2*, инактивация гена *CHEK2* в гетерозиготном состоянии не сопровождается повышением риска РЯ [Krylova N.Y. et al., 2007; Suspitsin E.N. et al., 2009].

Мутации гена *NBS1/NBN* (OMIM#602667) описаны у онкологических больных из Польши, Чехии, Белоруссии и России [Górski et al., 2003; Seemanová E. et al., 2006; Ebi H. et al., 2007; Bogdanova et al., 2008]. В России на долю наследственных мутаций гена *NBS1* приходится около 1% случаев РМЖ [Buslov K.G. et al., 2005]. Носительство мутации 657del5 в гене *NBS1* в гетерозиготном состоянии наблюдается преимущественно у славян и ассоциировано с промежуточным риском развития РМЖ [Соколенко А.П. и соавт., 2016]. Пациентки с РЯ не характеризуются повышенной частотой дефектов данного гена. Мутация 657del5 приводит к нарушению трансляции

и образованию двух неактивных частей белка нибрина (Таблица 7) [Seemanova E. et al., 2006].

Таблица 7. Типы часто встречающихся мутаций в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* [Havranek O. et al., 2015; Jiri B., Jiri L., 2003; Dong X. et al., 2003, Williams G.J. et al., 2010; Seemanova E. et al., 2006; German J. et al., 2007].

Мутация	Экзон	Белковый домен	Тип мутации
<i>CHEK2</i> 1100delC	10	Протеин-киназный домен, фосфорилирует эффекторные белки	Делеция одного нуклеотида (цитозин) в ДНК в 1100-ом положении
<i>CHEK2</i> IVS2+1G>A	2	Киназ-активирующий домен, регулирует белок-белковые взаимодействия	Однонуклеотидная замена (гуанина на аденин) на границе 2-го экзона и 2-го интрона в ДНК приводит к образованию нового 5'-сайта сплайсинга во 2-ом интроне пре-иРНК и добавлению 4-х новых нуклеотидов в зрелой иРНК
<i>CHEK2</i> 5395del	8 и 9	Протеин-киназный домен, фосфорилирует эффекторные белки	Делеция 5395-ти нуклеотидов в ДНК протяженностью с 7-го по 9-ый интроны с потерей 8-го и 9-го экзонов
<i>NBS1</i> 657del5	6	N-концевой домен, обеспечивает связь комплекса MRN с фосфорилированными белками в процессе репарации ДНК	Делеция 5-ти нуклеотидов в ДНК в 657-ом положении приводит к преждевременной терминации трансляции и ее возобновлению с нового стартового кодона в иРНК
<i>BLM</i> 1642C>T	7	Каталитический домен, разрывает водородные связи в ДНК	Однонуклеотидная замена (цитозина на тимин) в ДНК в 1642-ом положении приводит к преждевременному образованию стоп-кодона в иРНК

Мутации в гене *NBS1* в гомозиготном состоянии вызывают синдром Ниймегена (Nijmegen Breakage Syndrome), характеризующийся иммунодефицитом, генетической нестабильностью и повышенной предрасположенностью к развитию лимфоидных новообразований. Соматические мутации в гене *NBS1* выявляются в 10-20% случаев

ненаследственных форм острого лимфобластного лейкоза [Заридзе Д.Г., 2004].

Так же, в развитии РМЖ была установлена роль носительства мутаций в гене *BLM* (OMIM#604610). Этот ген кодирует один из ферментов системы геликаз, входящий в состав белкового комплекса, участвующего в эксцизионной репарации неспаренных оснований ДНК. Среди российских пациенток с РМЖ продемонстрирована высокая частота мутации *BLM* 1642C>T (1.2%) по сравнению с популяционной частотой (0.2%). Данная мутация связана с преждевременной остановкой синтеза геликазы и образованием короткого продукта (Таблица 7) [German J. et al., 2007].

Указанный аллель гена *BLM* ассоциирован с отягощенным семейным онкологическим анамнезом, молодым возрастом пациенток на момент постановки диагноза РМЖ и первично-множественным характером заболевания [Sokolenko A.P. et al., 2012]. Помимо РМЖ, патогенные аллели гена *BLM* связаны с умеренным увеличением риска развития колоректального рака [Voer D.M. et al., 2015]. Гомозиготная инактивация гена *BLM* приводит к развитию синдрома Блума, характеризующегося выраженной задержкой роста, нарушением фертильности и высоким риском развития новообразований различных локализаций.

Значение выявления наследственных форм рака молочной железы.

Прогноз заболевания у пациентов с РМЖ строится на основе нескольких факторов: возраст пациента, размер опухоли, степень злокачественности, молекулярный фенотип опухолевых клеток и т.д. Однако, все пациенты с РМЖ крайне неоднородны в своем ответе на получаемое противоопухолевое лечение [Каприн А.Д., Старинский В.В. и соавт., 2017]. Поэтому с практической точки зрения важное значение имеет влияние мутаций конкретных генов на прогноз и эффективность системного лечения наследственного РМЖ. В связи с этим, диагностика наследственных форм

РМЖ в значительной мере отражается на организации оказания медицинской помощи при этой категории рака [Имянитов Е.Н., 2010; Lynch H. et al., 2009; Narod S., Foulkes W., 2004]. Во-первых, выявление мутации позволяет изменить тактику лечения у самих пациенток с наследственным РМЖ. Во-вторых, подтверждение наследственного характера рака позволяет выявить носителей онкоассоциированных мутаций среди пока еще здоровых родственников пациенток. Для женщин-носительниц мутаций могут быть разработаны рекомендации по профилактике и ранней диагностике рака [Turnpenny P., Ellard S., 2009; Имянитов Е.Н., 2011]. Однако на сегодняшний день такого рода рекомендации разработаны только в случае носительства высоко пенетрантных мутаций в генах наследственного РМЖ [Соколенко А.П. и соавт., 2016].

1. Неoadьювантное лечение рака молочной железы.

Неoadьювантная (дооперационная) лекарственная терапия становится все более широко применяемым методом системной терапии РМЖ. Она заключается в проведении системного противоопухолевого лечения при помощи химиотерапии, гормонотерапии, таргетной терапии или сочетания этих методов до начала местного лечения. Первоначально данный метод рассматривался как подход к лечению больных с местно-распространенными первично неоперабельными формами рака. При первично операбельном РМЖ время проведения лекарственной терапии (до или после операции) не влияет на отдаленные результаты лечения [Клинические рекомендации по диагностике и лечению больных раком молочной железы, 2014]. Однако предоперационная (неoadьювантная) лекарственная терапия при первично операбельном РМЖ имеет ряд преимуществ и позволяет [Гарбуков Е.Ю. и соавт., 2005]:

- уменьшить объем первичной опухоли при операбельных формах рака для выполнения органосохраняющих операций и проведении индукционной

терапии при местнораспространенных процессах с целью их перевода в операбельное состояние;

- адекватно планировать адъювантное лечение при определении чувствительности первичной опухоли к проводимой химиотерапии *in vivo* и по результатам оценки эффективности лечения;

- улучшить отдаленные результаты лечения.

Наиболее эффективной ХТ для системного лечения РМЖ на сегодняшний день считается режим использования препаратов из групп антрациклинов и таксанов [Kaufmann M. et al., 2012; Makhoul I. et al., 2011].

Антрациклины являются ДНК-связывающими агентами. К ним относятся ингибиторы ферментов репликации – топоизомераз (белок TOP2a). Эти ферменты предотвращают спутывание и «заузливание» ДНК при ее деспирализации. Топоизомеразы служат мишенями цитостатиков, которые вызывают повреждения ДНК и нарушение ее репликации и репарации, что ведет к клеточной гибели. Молекулы антрациклинов способны встраиваться между соседними азотистыми основаниями нуклеотидов в одноцепочечной молекуле ДНК, образуя устойчивые связи и подавляя матричные процессы в клетке. Другим механизмом противоопухолевой активности этой группы препаратов является возникновение одноцепочечных и двуцепочечных разрывов в молекуле ДНК под воздействием свободных радикалов, которые образуются при активации антрациклинов пероксисомами [Beretta G.L., Zunino E., 2007].

Препараты из группы таксанов обладают противоопухолевым эффектом за счет связывания с микротрубочками нитей веретена деления в клетке в процессе митоза. Связываясь с тубулином, молекулы таксанов способствуют сборке и блокируют последующую разборку микротрубочек, фиксируя их длину. Блок деполимеризации микротрубочек способствует аресту митоза, что ведет клетку к запрограммированной гибели – апоптозу [Alberts B. et al., 2012; Ojima I. et al., 2016].

2. Химиочувствительность наследственного рака молочной железы.

Все варианты наследственного РМЖ отличаются от спорадических форм рака не только по клинико-биологическим показателям, но и по спектру мутаций кандидатных генов («генов интереса»), приводящих к развитию злокачественной опухоли. Поэтому каждый вариант РМЖ можно считать самостоятельным молекулярно-биологическим подтипом рака. В пользу такого представления свидетельствуют многочисленные данные касательно особой лекарственной восприимчивости РМЖ у носителей наследственных онокоассоциированных мутаций. Так, опухоли при *BRCA1*-ассоциированном раке характеризуются высокой чувствительностью к антрациклинам и резистентностью к «золотому стандарту» лечения РМЖ - препаратам из группы таксанов [Butski T. et al., 2010]. Таксаны оказывают противоопухолевый эффект через индукцию *BRCA1*-регулируемого апоптоза в раковых клетках [James C.R. et al., 2007]. Но дефицит белка *BRCA1* в мутантной клетке может приводить к формированию резистентности к доцетакселу или паклитакселу. Высокая чувствительность к антрациклинам может быть связана как с дисфункцией белка *BRCA1*, так и с высокой экспрессией топоизомеразы TOP2a, являющейся молекулярной мишенью этих препаратов в клетке [Miyoshi Y. et al., 2008].

В то же время, опухолевые клетки молочной железы, утратившие оставшийся нормальный аллель гена *BRCA1*, демонстрируют дефицит компонентов системы репарации ДНК [Iyevleva A.G., Imyanitov E.N., 2016]. Поэтому *BRCA1*-дефицитные клетки проявляют исключительную уязвимость при лечении препаратами платины (Цисплатин), не входящими в стандарты терапии карцином молочной железы [Moiseyenko V. M. et al., 2010]. Препараты платины (цисплатин, карбоплатин) вызывают формирование внутрипочечных и межпочечных сшивок, ковалентно связывающих нити ДНК, что нарушает матричные процессы [Deans A.J., West

S.C., 2011]. Значение исследований мутаций гена *BRCA1* не ограничивается только семейными случаями рака. Показано, что «трижды-негативный» молекулярный подтип РМЖ (ER-/PR-/HER2-) зачастую характеризуется соматической инактивацией гена *BRCA1* и также может демонстрировать чувствительность к препаратам платины [Имянитов Е.Н., 2013].

Глава 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**Дизайн научного исследования.**

В результате проведения настоящего научного исследования было осуществлено ретроспективно-проспективное изучение молекулярно-генетических, молекулярно-биологических и клинических характеристик наследственных форм РМЖ, а также определение спектра лекарственной чувствительности клеток опухолей. Кроме того, в работе были идентифицированы и проанализированы три разновидности наследственного РМЖ, а именно: *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированный рак. Исследование проводилось на биологическом материале, полученном от пациенток ретроспективной и проспективной групп, составляющих экспериментальную выборку, и контрольных групп. Научная работа включала 4 относительно независимых этапа исследования (Рисунок 7).

Этапы проведения научных исследований:

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

II. Получение и молекулярно-биологическая характеристика клеточных культур из карцином молочной железы от носительниц наследственных мутаций в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*.

III. Изучение клинических особенностей *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-опосредованных опухолей молочной железы.

IV. Изучение химиочувствительности опухолей молочной железы у носительниц мутаций в генах *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*.

Материалы исследования.

В результате проведенной работы были сформированы и проанализированы две группы больных РМЖ - ретроспективная и проспективная. (Рисунок 7).

Основным материалом для исследования послужили образцы крови и опухолевой ткани пациенток с *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированным РМЖ, выявленным посредством проспективного и ретроспективного 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 год. 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 неоадьювантную химиотерапию ($n = 9$), были включены в анализ лекарственной чувствительности клеток опухолей молочной железы. Материал биопсии опухолевой ткани, полученный во время операции у оставшейся группы пациенток ($n = 44 - 9 = 35$) без неоадьювантной терапии, использовали для создания клеточных линий (КЛ).

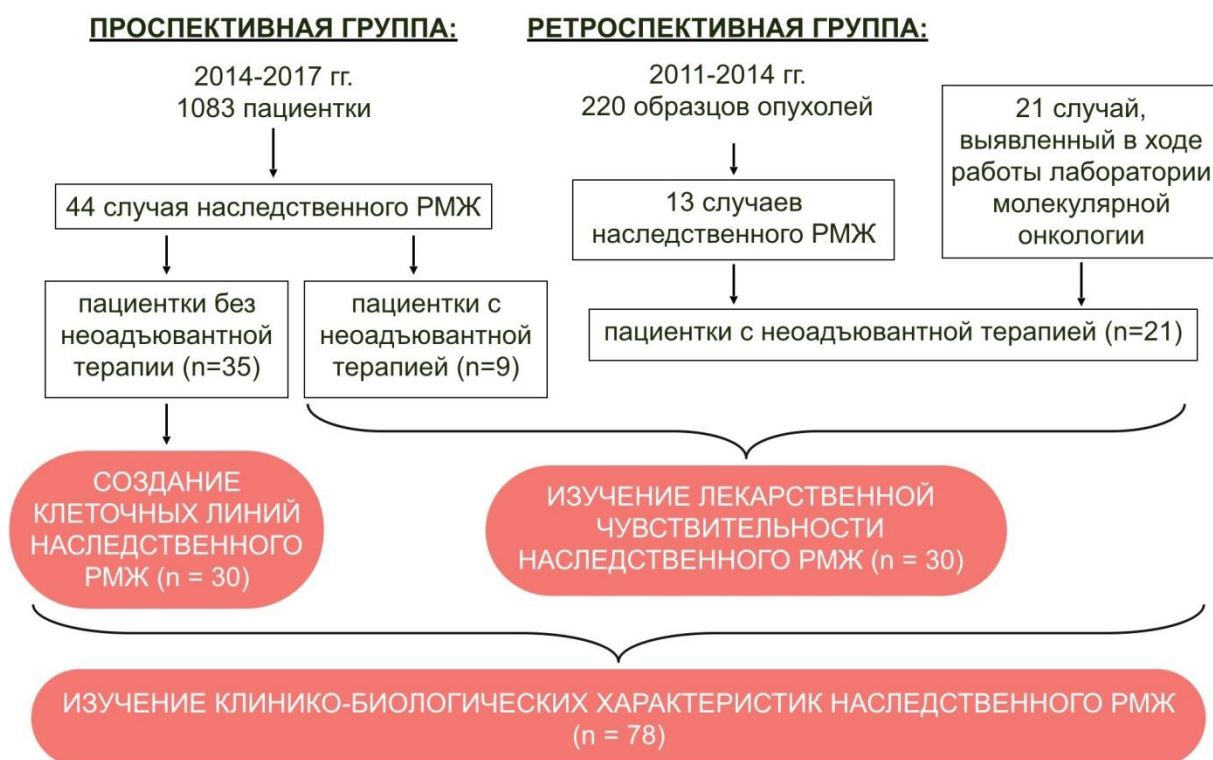


Рисунок 7. Формирование экспериментальной выборки пациенток с РМЖ.

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 год. Для генотипирования были отобраны 220 архивных образцов опухолей от пациенток, получавших неoadьювантную терапию. 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 неoadьювантной терапии, негативных в отношении распространённых наследственных мутаций.

Помимо описанных выше экспериментальных групп пациенток с изучаемыми мутациями «генов-интереса», 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 путем 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 клеток крови.

В процессе исследований проводили 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 течении 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: 1хTE (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 в режиме реального времени производился поиск «мажорных» 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). Отметим, что ПЦР в реальном времени является количественной методикой определения выхода ПЦР-продукта после каждого цикла амплификации с использованием флуоресцентных красителей. Оценка результатов ПЦР основана на повышении уровня флуоресценции, который прямо пропорционален

количеству ПЦР-продукта и регистрируется автоматически с помощью компьютера. 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 течение 35" при температуре 72°C. В исследовании применялись праймеры, соответствующие мутациям и аллелям «дикого типа». Все виды использованных для ПЦР праймеров представлены в таблице 8 [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. Образец признается положительным (содержащим мутацию), если dCt образца равно или меньше dCt положительного стандарта. Образец считается отрицательным (без мутации или содержание мутации менее 5%), если dCt образца больше dCt стандарта. Количество циклов ПЦР, необходимых для того, чтобы флуоресценция образца превысила уровень фона, называется Ct. ПЦР с аллель-специфическими праймерами на ДНК с мутацией ведет к уменьшению Ct на несколько циклов по сравнению с ДНК без мутаций, что позволяет отличить ДНК с мутацией от нормальной ДНК.

Детекция мутации NBS1 657del5 осуществлялась посредством высокоразрешающего плавления ПЦР-продукта (High Resolution Melting Analysis - HRMA). На первом этапе анализа проводилась ПЦР-амплификация последовательности фрагментов ДНК размером 100-250 п.н., а далее - высокоточное нагревание ПЦР-продукта, в ходе которого молекулы ДНК постепенно переходила из двухцепочечного состояния в одноцепочечное. При этом из одноцепочечной ДНК высвобождается краситель, и уровень флуоресценции в точке плавления (T_m) резко падает. Температура плавления зависит от нуклеотидного состава, поэтому сравнивают кривые плавления

изучаемых образцов с образцами, имеющими известную последовательность нуклеотидов. 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".

Таблица 8. Геномные праймеры, соответствующие мутациям в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM* [Соколенко А.П. и соавт. 2008].

Мутация	Тип	Длина фрагмента	Последовательность
CHEK2 1100delC	общий	120 п.о.	5'-CTGATCTAGCCTACGTGTCT-3'
	wt		5'-TTGGAGTGCCCAAAATCAGT-3'
CHEK2 ivs2+1G>A	общий	114 п.о.	5'-CAGACTTTGAATAGCAGAGA-3'
	wt		5'-ACACTTTCGGATTTTCAGGG-3'
CHEK2 5395del	общий	139 п.о.	5'-TGGGAAGTCAAGGCTGTAAT-3'
	wt		5'-ATGGCGTAAGATTTGCATATA-3'
NBS1 657del5	общий	198 п.о.	5'-GCAAACATAGTAGTATATAATTAG-3'
	обратный		5'-CTTTAGGAAAATTTAGCTTATAAC-3'
BLM 1642C>T	общий	141 п.о.	5'-TGATGGGTTGATAGGCAGC-3'
	wt		5'-ATGACTTAGAAAGAGAAACCC-3'
	mut		5'-ATGACTTAGAAAGAGAAACCT-3'

wt - праймер соответствует аллелю «дикого типа»;

mut - праймер соответствует мутации;

п.о. - пара оснований.

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

Клеточные линии (КЛ) наследственных карцином МЖ были получены из образцов опухолей пациенток, не подвергавшихся неoadьювантной химиотерапии (n = 35). После подтверждения молекулярного дефекта в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*, производился забор опухолевой ткани молочной железы 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 года в лаборатории НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова были 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 ткани 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 раствор 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 Хенкса (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 Хенкса 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 мМ/мл глутамина, 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.

Для получения молекулярно-биологических параметров КЛ использовали иммуноцитохимический скрининг, в основе которого лежит

специфическая реакция «антиген – антитело», приводящая к образованию комплексного осадка. Для детекции результатов реакции антитела помечаются специальной флуоресцентной меткой.

К биологическим параметрам КЛ относят следующие молекулярные маркеры клеток МЖ:

- Мембранный рецептор эпидермального фактора роста (HER2) и ядерный рецептор прогестерона и эстрогенов (PgR, ER), которые представляют собой стандартный набор маркеров для фенотипической характеристики молекулярных подтипов РМЖ.

- Трансмембранный гликопротеин CD44 - рецептор гиалуроновой кислоты. Известно, что опухоли эпителиального происхождения экспрессируют различные изоформы трансмембранного гликопротеина CD44, участвующего в процессах клеточного деления [Basakran N.S., 2015; Olsson E. et al., 2011].

- Белок клеточной адгезии CD24 - небольшой периферический белок клеточной мембраны, который в опухолевых клетках вовлечен в процессы адгезии и метастазирования [Jaggurilli A. et al., 2012].

- Белки субмембранного опорно-сократительного аппарата - цитокератины СК5/6, СК14. экспрессия которых в значительном количестве повышена в высокодифференцированных опухолях МЖ [Shao M.M. et al., 2012].

Для выполнения иммуноцитохимического анализа опухолевые клетки переносили на адгезионные стекла и культивировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. После культивирования и адгезии клеток на поверхность стекла их замораживали, затем через 24 часа фиксировали и дважды окрашивали с помощью флуоресцентно меченых антител: первично - специфическими к клеточным структурам антителами (смотри ниже), повторно - 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 как биологические параметры опухолевых клеток были изучены на трех наиболее стабильных культурах клеток: *CHEK2*-позитивной (C22), *NBS1*-позитивной (N5) и *BLM*-позитивной (B3) 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 клеточных линий к химиопрепаратам.

Аналізу химиочувствительности были подвергнуты две наиболее стабильно растущие КЛ: *CHEK2*-позитивная (C22) и *NBS1*-позитивная (N5). Определяли лекарственную чувствительность с помощью индукции апоптоза к следующим химиотерапевтическим препаратам: актиномицину, таксолу, цисплатину. Для оценки воздействия препарата использовали методику окрашивания клеток красителями: флуоресцеином изотиоцианатом аннексина V и пропидием йодидом (PI). Аннексин V, также известный как плацентарный антикоагулянтный протеин (PAF I), относится к кальций-зависимым белкам, связывающим фосфолипиды плазматической мембраны клеток. Одним из биохимических изменений, наблюдающихся уже на ранней стадии апоптоза, является транслокация фосфатидилсерина с внутренней поверхности мембраны на наружную. Аннексин V с высокой аффинностью связывается с фосфатидилсерином клеточной поверхности, способствуя выявлению апоптотических клеток. Клетки, позитивные по аннексину, считались апоптотическими, позитивные по обоим красителям - аннексину и PI -- 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 течение 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 молочной железы среди пациенток.

Проанализированно 2 когорты больных РМЖ (1083 и 220, всего-1303). Среди 1303 пациенток было детектировано 57 случаев носительства мутаций в искомым генах (44- в ходе проспективного скрининга мутации и 13 при анализе архивного материала). Из них было идентифицировано носительство мутации гена *CHEK2* (n = 43), *NBS1* (n = 8) и *BLM* (n = 6), Кроме того, при анализе результатов были использованы данные третьей группы пациенток с РМЖ (n= 21) -носительниц мутаций в гене *CHEK2*- 4, в гене *NBS1* - 4 и в гене *BLM* -13, которые имелись в распоряжении коллекции лаборатории молекулярной онкологии. Поэтому экспериментальная группа в целом составила 78 (57+21) пациенток с наследственным РМЖ, включая 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 молочной железы 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 типы карцином молочной железы.

Размеры опухоли, вовлеченность в патологический процесс регионарных лимфатических узлов и стадия заболевания оценивались в соответствии с классификацией TNM (Международный противораковый союз, 2003 г.) Для определения гистологического типа карцином (дольковый, протоковый и другие формы рака) использовали медицинскую документацию, содержащую заключения патоморфологических исследований опухолевой ткани. Для определения молекулярного типа карцином оценивали уровень экспрессии основных молекулярных маркеров РМЖ (ER, PgR, HER2) по данным заключения иммуногистохимического исследования.

IV. Изучение химиочувствительности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-опосредованных опухолей молочной железы среди пациенток с неoadьювантной терапией.

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 годов (n = 105). Все больные, вошедшие в контрольную группу, также получали дооперационную (неoadьювантную) лекарственную терапию.

В ходе анализа оценивали чувствительность опухолей к стандартным комбинациям химиопрепаратов, применяемым для лечения рака молочной железы (доксорубицин + таксол; циклофосфамид + метотрексат + 5-

фторурацил; циклофосфамид + доксорубицин и др.). Варианты схем ХТ, применявшихся для лечения пациенток с РМЖ, приведены в таблице 9.

Для удобства анализа химиочувствительности все терапевтические схемы лечения были разделены на три большие категории в зависимости от групп химиопрепаратов, присутствующих в неоадьювантном режиме терапии. Первая категория ХТ включала только препараты антрациклинового ряда, без добавления препаратов таксанового ряда. Вторая категория ХТ - препараты таксанового ряда с добавлением или без добавления препаратов антрациклинового ряда. Третью категорию ХТ представляли другие режимы, включающие комбинации препаратов, не относящихся к антрациклиновому и таксановому ряду.

Таблица 9. Варианты используемых схем неоадьювантной химиотерапии.

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

А - доксорубицин (адриамицин);
Т - доцетаксел (таксотер);
С - циклофосфамид (циклофосфан);
М - метотрексат;
F - 5-фторурацил;
Е - эпирубицин.

Эффективность неоадьювантного 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 через 10 дней после окончания последнего курса ХТ. Размер таргетного очага оценивался путем расчета суммы его наибольших размеров в поперечном и продольном направлениях (SPD).

Шкала оценки клинического ответа на проводимое противоопухолевое лечение RECIST 1.1:

1. Полный клинический ответ (ПКО): отсутствие таргетных очагов опухоли (или лимфатических узлов размером 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 вышеописанному.

Статистическая обработка полученных результатов исследования

Статистический анализ полученных результатов исследования проводился 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 доверительной (предельной) погрешности $p \leq 0.05$ [Юнкеров В.И., Григорьев С.Г., 2002; Двойрин В.В., Клименков А.А., 1985].

Глава 3

РЕЗУЛЬТАТЫ**I. Результаты молекулярно-генетического скрининга среди пациенток с раком молочной железы.**

Молекулярно-генетический скрининг, направленный на поиск мутантных аллелей «генов-интереса» *CHEK2* 1100delC, *CHEK2* ivs2+1G>A, *CHEK2* del5395, *NBS1* 657del5, *BLM* 1642C>T проводили среди пациенток с РМЖ, составляющих экспериментальную выборку. Формирование экспериментальной выборки пациенток с РМЖ представлено в таблице 10. В ней описано количество пациенток и идентифицированных мутантных аллелей исследуемых генов: *CHEK2* 1100delC, *CHEK2* ivs2+1G>A, *CHEK2* del5395, *NBS1* 657del5, *BLM* 1642C>T. Экспериментальная выборка была составлена из 3 групп пациенток: проспективной (n = 1083), ретроспективной (n = 220) и коллекции лаборатории (n = 21), которые различались по способу получения биологических образцов - лейкоцитов периферической крови (проспективная группа, коллекция лаборатории) и архивных парафиновых блоков (ретроспективная группа, коллекция лаборатории).

Как следует из таблицы 10, из 1083 пациенток проспективной группы, в 44 образцах крови были идентифицированы 34 мутантных аллеля гена *CHEK2*, 6 - гена *NBS1*, 4 - гена *BLM*.

Среди 220 доступных архивных образцов опухолевой ткани, полученных от пациенток с РМЖ, было обнаружено 13 носителей часто встречающихся мутаций «генов-интереса». Из них, 9 пациенток являлись носительницами мутаций в гене *CHEK2*, 2 пациентки - в гене *NBS1* и еще 2 пациентки - в гене *BLM*.

Таблица 10. Число пациенток экспериментальной выборки при идентификации мутаций генов, ассоциированных с наследственным РМЖ.

Число пациенток	Пациентки с наследственным РМЖ	Носительницы мутаций в гене <i>CHEK2</i> (1100delC, ivs2+1G>A, del5395)	Носительницы мутаций в гене <i>NBS1</i> (657del5)	Носительницы мутаций в гене <i>BLM</i> (1642C>T)
1083 проспективная группа	44	34	6	4
220 ретроспективная группа	13	9	2	2
21 коллекция лаборатории	21	4	4	13
Всего	78	47	12	19

Помимо описанных выше проспективной и ретроспективной групп пациенток с изучаемыми мутациями «генов-интереса», 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. Среди них 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 мутантных генов, среди которых идентифицированы 47 мутации в гене *CHEK2*, 12 - в гене *NBS1*, 19 - в гене *BLM*.

Поиск и идентификация «мажорных» мутаций в генах *BRCA1*, *CHEK2* и *BLM* распространенных в славянской популяции производился с помощью

метода аллель-специфической ПЦР в режиме реального времени. Поскольку мутации в гене *BRCA1* часто встречаются среди российских пациенток с наследственным РМЖ, то в первичный генетический скрининг входили аллели гена *BRCA1*: 5382insC, 4153delA, 185delAG для того, чтобы исключить из дальнейшего исследования случаи *BRCA1*-ассоциированных опухолей МЖ.

Поиск «мажорных» мутаций в гене *NBS1* производился методом высоко разрешающего плавления ПЦР-продукта, потому как ПЦР-анализ не позволяет идентифицировать мутацию, представляющую собой делецию размером в 5 нуклеотидов.

В ходе ДНК-анализа 1083 образцов крови и 220 архивных образцов парафиновых блоков опухолей, были идентифицированы мутантные аллели соответствующих «генов-интереса»: *CHEK2* 1100delC, *CHEK2* ivs2+1G>A, *CHEK2* del5395, *NBS1* 657del5, *BLM* 1642C>T. Данные об идентификации мутаций представлены на рисунках 8 - 10.

На рисунке 8 изображены кривые зависимости относительной интенсивности флуоресценции образцов ДНК от числа циклов амплификации, полученные методом ПЦР в реальном времени с применением флуорофоров. Метод позволяет идентифицировать мутации в гене *CHEK2*, основываясь на изменении уровня флуоресценции при проведении циклов ПЦР с аллель-специфическими праймерами. В качестве контроля использовали образец ДНК человека, содержащий нормальный аллель («дикого типа» - «wt») гена *CHEK2*; экспериментальный образец содержал мутантную ДНК, выделенную из клеток пациенток с РМЖ с искомой мутацией гена *CHEK2* (*CHEK2* ivs2+1G>A). Амплификацию ДНК проводили с помощью контрольных - «wt» (5'-ACACTTTCGGATTTTCAGGG-3') и аллель-специфических (5'-ACACTTTCGGATTTTCAGGA-3') праймеров для мутантного аллеля гена *CHEK2* ivs2+1G>A. Приведенные результаты ПЦР в режиме реального времени на рисунке 8-А отражают разные величины пороговой

CHEK2 ivs2+1 G>A

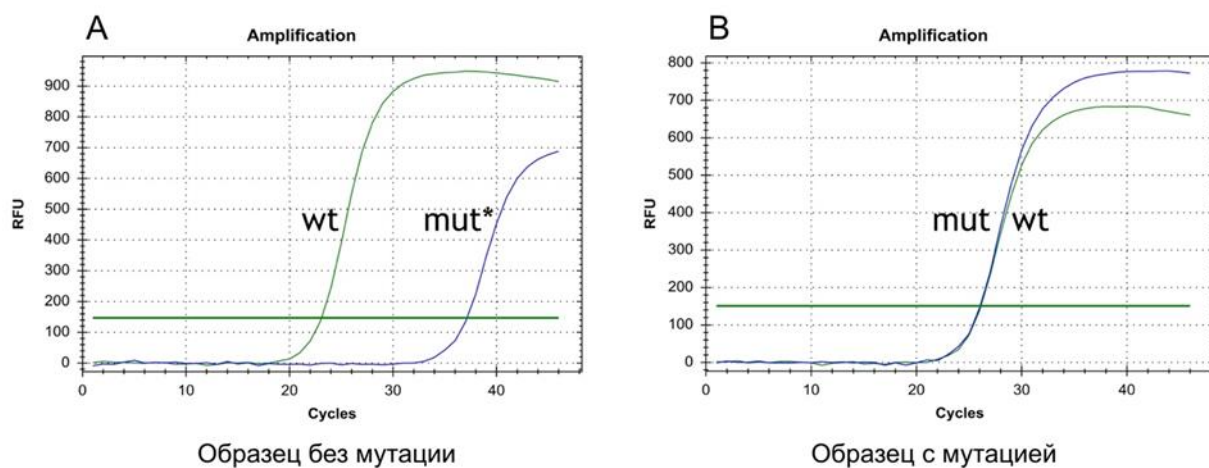


Рисунок 8. Детекция мутантного аллеля *ivs2+1G>A* гена *CHEK2* методом аллель-специфической ПЦР-РВ.

А - нормальная гомозигота (отмечается поздняя неспецифическая амплификация мутантного аллеля);

В - гетерозигота (соотношение нормального и мутантного аллеля 1:1);

wt - кривая амплификации аллеля дикого типа;

mut - кривая амплификации мутантного аллеля;

mut* - кривая неспецифической амплификации.

флуоресценции в контрольном образце: $Ct \sim 23$ для праймеров к нормальному аллелю («wt») и $Ct \sim 37$ для аллель-специфических праймеров. Более поздняя амплификация ($Ct \sim 37$) свидетельствует о неспецифичности процесса и отсутствии мутации в образце ДНК, который представляет собой гомозиготу по нормальному аллелю («wt/wt»). На рисунке 8-В отражены близкие величины пороговой флуоресценции $Ct \sim 26,0$ нормального и мутантного аллеля (соотношение составляет примерно 1:1), из чего следует, что экспериментальный образец-ДНК содержит мутантный аллель *CHEK2* *ivs2+1G>A* в гетерозиготном состоянии, поскольку его dCt равно или меньше dCt контроля.

Таким же образом была проведена детекция других мутантных аллелей гена *CHEK2* (*CHEK2* 1100delC, *CHEK2* del5395) с использованием соответствующих «wt» (5'-TTGGAGTGCCCAAATCAGT-3', 5'-ATGGCGTAAGATTTGCATATA-3') и аллель-специфических (5'-СТТGGAGTGCCCAAATCAT-3', 5'-CATGTTGGCCAGGTTTGAG-3') праймеров. Графическое отображение результатов идентификации совпадает с приведенными кривыми на рисунке 8.

На рисунке 9-А изображены подобные предыдущему рисунку 8 кривые зависимости относительной интенсивности флуоресценции образцов ДНК от числа циклов амплификации, полученные методом ПЦР-РВ, который позволяет обнаружить мутации в гене *BLM*: 1642C>T (Q548X). Амплификацию ДНК проводили с помощью контрольных - «wt» (5'-ATGACTTAGAAAGAGAAACCC-3') и аллель-специфических (5'-ATGACTTAGAAAGAGAAACCT-3') праймеров для мутантного аллеля *BLM* 1642C>T (Q548X). При детекции мутаций в гене *BLM*, так же как в гене *CHEK2*, приведенные результаты ПЦР на графике 9-А отражают разные величины пороговой флуоресценции – $Ct \sim 23$ при использовании контрольных праймеров и $Ct \sim 35$ при аллель-специфических праймерах, что соответствует доминантной гомозиготе по нормальному аллелю или отсутствию мутации в образце ДНК. На графике 9-В отражены сходные

BLM Q548X

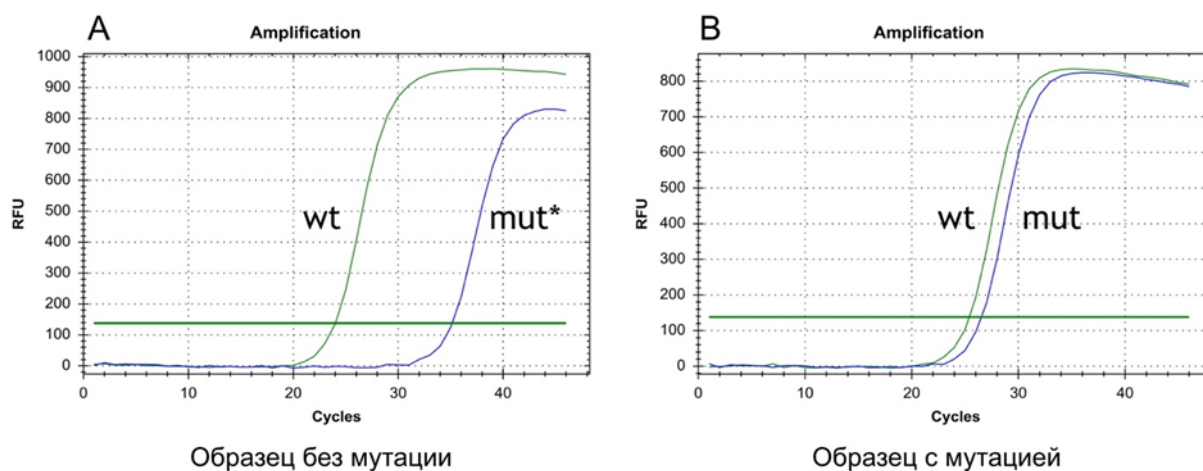


Рисунок 9. Детекция мутантного аллеля 1642C>T (Q548X) в гене *BLM* методом аллель-специфической ПЦР-РВ.

А - нормальная гомозигота (отмечается поздняя неспецифическая амплификация мутантного аллеля);

В - гетерозигота (соотношение нормального и мутантного аллеля 1:1);

wt - кривая амплификации аллеля дикого типа;

mut - кривая амплификации мутантного аллеля;

mut* - кривая неспецифической амплификации.

величины пороговой флуоресценции: $C_t \sim 25-26$, что соответствует наличию мутантного аллеля BLM 1642C>T (Q548X) в гетерозиготном состоянии.

На рисунке 10-А приведены кривые зависимости относительной интенсивности флуоресценции образцов ДНК от числа циклов амплификации, полученные методом ПЦР в реальном времени с применением флуорофоров для детекции мутации гена *NBS1*: 657del5, обусловленной потерей 5 нуклеотидов. Поскольку результаты ПЦР-анализа не позволяют однозначно идентифицировать делецию размером в 5 нуклеотидов, то далее был применен метод высокоточного определения температуры плавления ПЦР-продукта. В процессе эксперимента ДНК при нагревании постепенно переходила из двухцепочечного состояния в одноцепочечное, в результате чего с определенного момента (точка плавления - T_m) уровень флуоресценции резко падал за счет высвобождения молекул красителя. Температура плавления зависела от нуклеотидного состава образца. На рисунке 10-В приведены зависимости скорости изменения интенсивности флуоресценции от температуры ($-\partial(\text{RFU})/\partial T$) для образцов ДНК, соответствующих гомо- и гетерозиготе по гену *NBS1*. Гомозиготный образец (wt/wt) использовали в качестве контроля, которому на рисунке 10-В соответствует кривая зеленого цвета с одним пиком плавления. Гетерозиготному образцу соответствует синяя кривая, имеющая два пика плавления: больший синий пик совпадает с пиками плавления гомозиготных образцов («wt/wt», зеленая кривая), малый синий пик соответствует мутантному аллелю с делецией 5 нуклеотидов (*NBS1* 657del5).

NBS1 657del5

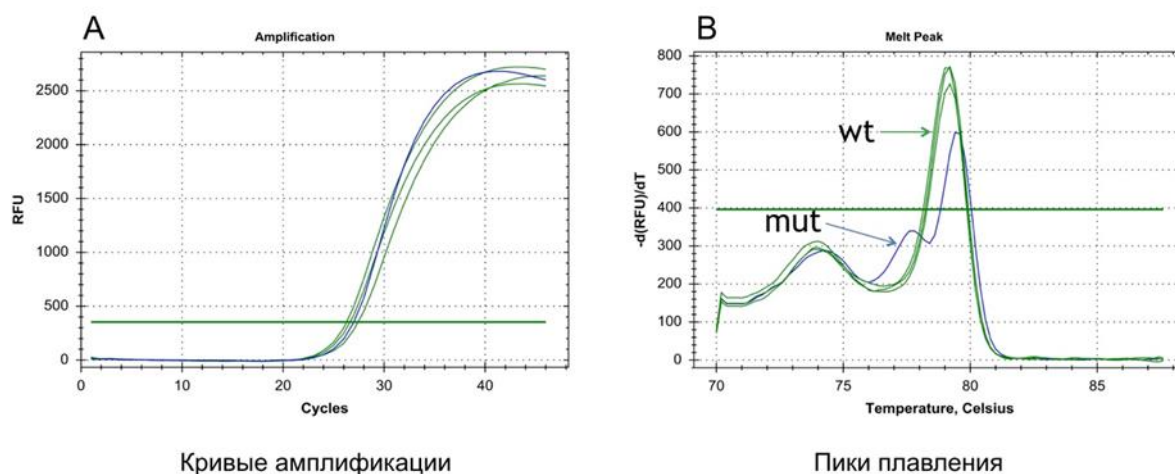


Рисунок 10. Детекция мутантного аллеля 657del5 в гене *NBS1* методами аллель-специфической ПЦР и дифференциального флуоресцентно-термического анализа высокого разрешения ПЦР-продукта с применением флуорофоров.

А - кривые флуоресценции образцов ДНК;

В - высокоразрешающее плавление продуктов ПЦР. Стрелкой показана кривая плавления образца с мутацией- делецией 5 нуклеотидов (NBS1 657del5).

wt - образцы без мутации;

mut - образцы с мутацией.

II. Получение и молекулярно-биологическая характеристика клеточных линий наследственного рака молочной железы.

1. Пролиферативная активность культур опухолевых клеток.

Для создания КЛ наследственного рака от 44 пациенток с РМЖ проспективной группы (с 2014 по 2016 гг.) было отобрано 35 образцов клеток опухолей с идентифицированными мутациями в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*. (Таблица 11). Образцы опухоли были получены во время оперативного лечения пациенток, не имевших неоадьювантной терапии в анамнезе. Перевивка опухолей в культуру клеток проводилась по стандартным методикам [Masters J.R.W., Palsson B., 1999; Kisselbach L. et al., 2009]. Из 35 образцов опухолей первично было получено 30 жизнеспособных клеточных культур, среди которых 22 линии клеток оказались *CHEK2*-позитивными, 5 - *NBS1*-позитивными и 3 - *BLM*-позитивными. В таблице 11 представлены данные о получении КЛ с указанием возраста пациенток, вариантов мутантных аллелей соответствующих генов; пролиферативной активности опухолевых клеток. Последняя оценивалась по количеству пассажей для каждой культуры клеток. Все линии клеток условно разбиты на 3 группы, в зависимости от дефектного гена: группа «С» - для мутаций в гене *CHEK2*, группа «N» - для мутаций в гене *NBS1*, группа «В» - для мутаций в гене *BLM*. Со временем из 30 первично полученных культур опухолевых клеток 20 линий утратили свою пролиферативную активность.

Таблица 11. Получение КЛ и их пролиферативная активность.

№	Название КЛ	Возраст пациентки	Мутантный аллель	Пассаж
1	C1	50	CHEK2 ivs2+1G>A	Утрачена пролиферативная активность
2	C2	68	CHEK2 5395del	Утрачена пролиферативная активность
3	C3	72	CHEK2 5395del	Утрачена пролиферативная активность
4	C4	61	CHEK2 5395del	Утрачена пролиферативная активность
5	C5	56	CHEK2 1100delC	Утрачена пролиферативная активность
6	C6	53	CHEK2 5395del	Утрачена пролиферативная активность
7	B1	53	BLM Q548X	Первичная культура клеток не создана
8	N1	68	NBS1 657del5	Утрачена пролиферативная активность
9	C7	33	CHEK2 1100delC	Недостаточное количество клеток для роста культуры
10	C8	77	CHEK2 ivs2+1G>A	Утрачена пролиферативная активность
11	C9	74	CHEK2 ivs2+1G>A	Утрачена пролиферативная активность
12	C10	48	CHEK2 1100delC	Утрачена пролиферативная активность
13	N2	64	NBS1 657del5	Утрачена пролиферативная активность
14	C11	70	CHEK2 ivs2+1G>A	Утрачена пролиферативная активность
15	C12	66	CHEK2 1100delC	Утрачена пролиферативная активность
16	C13	65	CHEK2 1100delC	Утрачена пролиферативная активность
17	B2	73	BLM Q548X	16

№	Название КЛ	Возраст пациентки	Мутантный аллель	Пассаж
18	C14	43	CHEK2 ivs2+1G>A	Утрачена пролиферативная активность
19	C15	54	CHEK2 1100delC	19
20	C16	67	CHEK2 ivs2+1G>A	Утрачена пролиферативная активность
21	C17	62	CHEK2 1100delC	Утрачена пролиферативная активность
22	N3	54	NBS1 657del5	15
23	N4	32	NBS1 657del5	18
24	C18	38	CHEK2 5395del	Утрачена пролиферативная активность
25	C19	70	CHEK2 5395del	12
26	C20	43	CHEK2 ivs1+2G>A	15
27	C21	54	CHEK2 ivs1+2G>A	6
28	N5	44	NBS1 657del5	36
29	C22	76	CHEK2 1100delC	21
30	B3	36	BLM Q548X	6

2. Изучение молекулярно-биологических характеристик клеточных линий.

Молекулярно-биологические характеристики опухолевых клеток изучали на трех наиболее стабильных клеточных культурах: *CHEK2*-позитивной (C22, *CHEK2* 1100delC), *NBS1*-позитивной (N5, *NBS1* 657del5) и *BLM*-позитивной (B3, *BLM* Q548X) линиях, с использованием иммуноцитохимического скрининга, окрашивая клетки с помощью флюоресцентно-меченных антител к конкретным молекулярным маркерам: рецептору эпидермального ФР (HER2), рецепторам прогестерона и эстрогенов (PgR, ER), трансмембранному гликопротеину CD44, клеточным адгезивным белкам CD24 и цитокератинам 5/6 и 14 типов (Рисунки 11 и 12).

Для оценки экспрессии биологических маркеров клеток МЖ суспензию с опухолевыми клетками наносили на поверхность адгезионного стекла, делили стекло на 6 областей и окрашивали каждую область специфическими антителами. С использованием флюоресцентной микроскопии производился визуальный подсчет количества интенсивности сигналов, полученных от вышеперечисленных молекулярных структур клеток, окрашенных с помощью антител. При этом уровень экспрессии биологических маркеров соответствовал интенсивности свечения сигналов и указывался в баллах от «0» до «3» (Таблица 12). При проведении флюоресцентной микроскопии использовали фильтры красного и зеленого цветов.

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».

На рисунке 11 приведены фотографии иммуно-цитохимического окрашивания коммерческой КЛ SK-BR-3, используемой в качестве контроля. Рисунок 11 содержит 6 областей адгезионного стекла, каждая из которых окрашена специфическими к структурам клетки флюоресцентно-мечеными антителами. При использовании фильтра зеленого цвета была оценена экспрессия цитокератинов, рецепторов прогестерона и эстрогенов, а также белков CD24 и CD44. При визуальном контроле были отмечены высокие уровни экспрессии рецепторов эстрогенов, цитокератина 14 типа и CD44, которые соответствовали 3 баллам, а также низкий уровень экспрессии рецептора прогестерона, который был оценен в 1 балл. Такие молекулярные маркеры как CD24 и CK5/6 демонстрировали нулевую экспрессию. При использовании фильтра красного цвета была оценена экспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2, которая оказалась высокой и соответствовала 3 баллам. Таким образом, контрольная КЛ оказалась позитивной по экспрессии рецепторов прогестерона (PgR+) и эстрогенов (ER+), рецептора эпидермального ФР (HER2+) - основных молекулярных

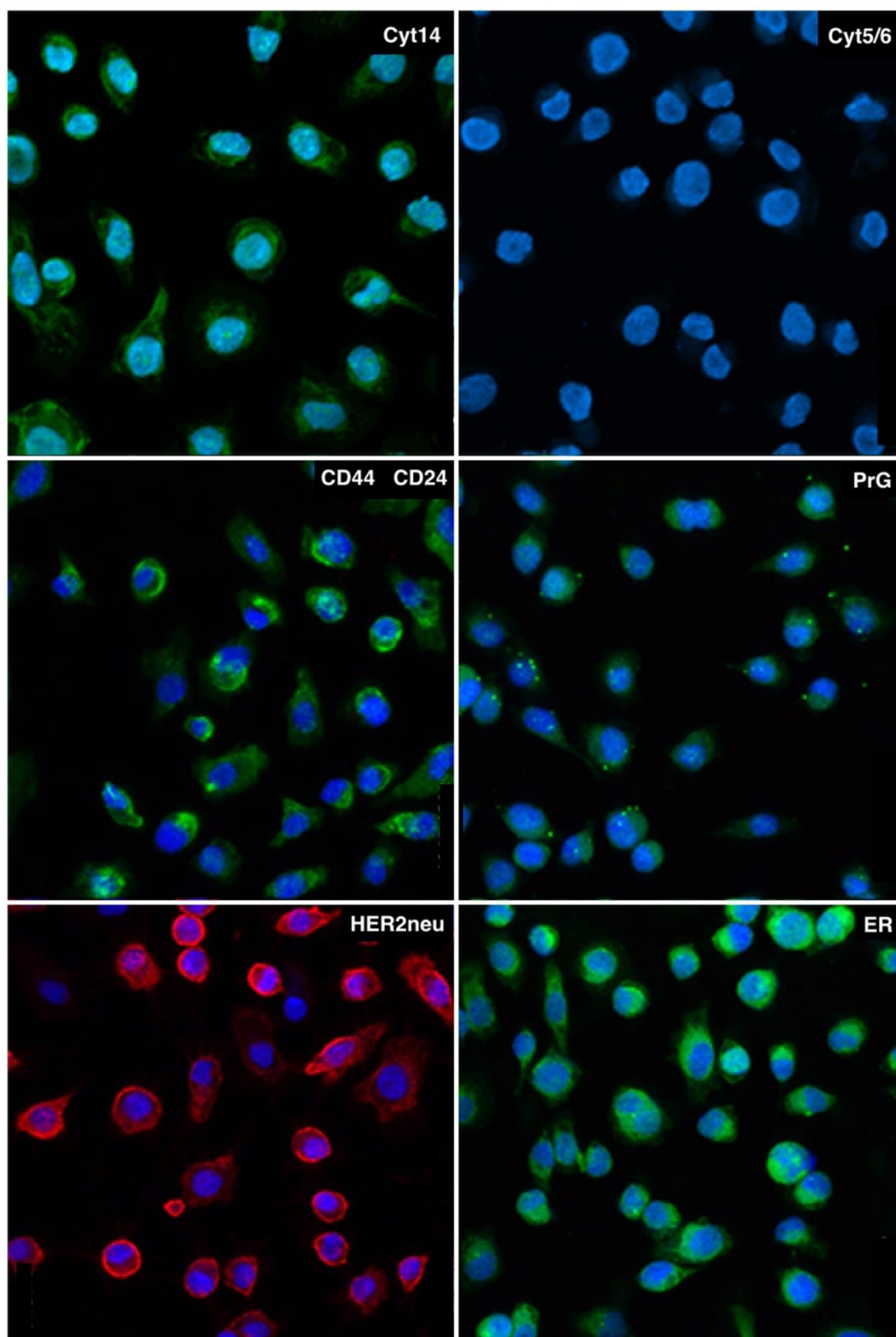


Рисунок 11. Иммуноцитохимическое окрашивание клеток контрольной (коммерческой) линии SK-BR-3 (HER2 3+, ER 3+, PgR 1+, CD44/CD24 3+/0, CK 5/6 0, CK14 3+).

- красный сигнал – экспрессия рецептора эпидермального фактора роста HER2;
- зеленый сигнал – экспрессия других молекулярных маркеров (ER, CD44/CD24, CK5/6, CK14);
- синим цветом окрашены ядра эпителиальных клеток молочной железы.

маркеров клеток МЖ, а также - позитивной по экспрессии трансмембранного гликопротеина CD44, который часто регистрируется в опухолевых клетках разного происхождения, и цитокератина СК14, обнаруживаемого в высоко дифференцированных опухолях.

Проведенный анализ контрольной КЛ показал, что эти клетки соответствуют высоко дифференцированным опухолевым клеткам МЖ.

На рисунке 12 (А, В, С) представлены фотографии результатов иммуноцитохимического окрашивания экспериментальных КЛ: А - линия С22, В - линия N5, С - линия В3, суспензии клеток которых нанесены на три адгезивных стекла. Каждое стекло разбито на 6 областей, окрашенных флюоресцентно-мечеными антителами, специфичными к определяемым молекулярным структурам клетки. Для определения уровня экспрессии в опухолевых клетках молекулярных маркеров HER2, ER, PgR, СК 5/6 и СК 14 использовали фильтр зеленого цвета. Уровни экспрессии маркеров CD44/CD24 оценивались дифференциально с использованием фильтра зеленого цвета (для CD44) и красного цвета (для CD24). При визуальном контроле интенсивности свечения, по которой определялся уровень экспрессии клеточных структур, присваивались баллы от «0» до «3».

Анализ основных молекулярных маркеров эпителиальных клеток МЖ показал, что линия N5 является ER-негативной, но позитивной в отношении экспрессии рецептора прогестерона (PgR 1+) и эпидермального ФР (HER2 1+). Линия С22 является трижды-позитивной (ER 1+, PgR 1+, HER2 2+); линия В3 - HER2-негативной, но позитивной в отношении рецепторов прогестерона (PgR 1+) и эстрогенов (ER 1+). Кроме того, проведенный анализ установил позитивную экспрессию биомаркеров CD24 и CD44, детектируемых на мембране опухолевых клеток эпителиального происхождения и играющих важную роль в инициации туморогенеза, развитии опухоли и процессах метастазирования, а также позитивную

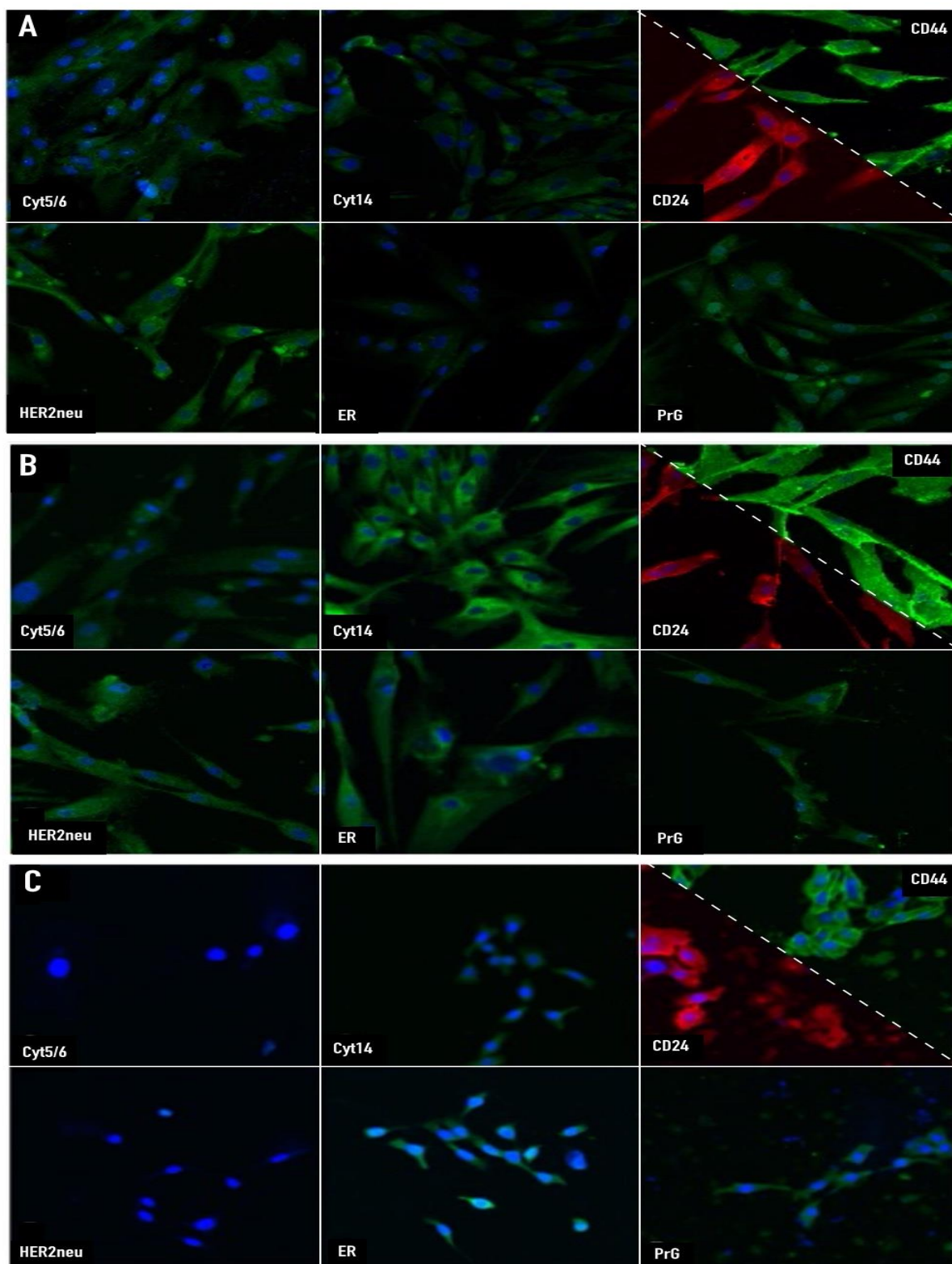


Рисунок 12. Молекулярное фенотипирование клеточных линий:

А - линия C22; В - линия N5; С - линия В3.

- красный сигнал – экспрессия периферических адгезивных белков CD24;
- зеленый сигнал – экспрессия остальных молекулярных маркеров (HER2, ER, CD44, CK5/6, CK14);
- синим цветом окрашены ядра эпителиальных клеток молочной железы.

экспрессию цитокератинов СК5/6 и СК14, характеризующих данные клетки как опухолевые с высокой дифференцировкой.

В таблице 12 в баллах указаны уровни экспрессии специфических белковых маркеров для контрольной и каждой из исследуемых КЛ. Максимальный уровень экспрессии соответствовал 3-м баллам, средний - 2-м баллам, слабый - 1 баллу, отсутствие экспрессии - 0 баллов. Обнаружение экспрессии основных молекулярных маркеров (HER2, ER, PgR, CD44, CD24, СК5/6, СК14) на первичных КЛ позволило провести их молекулярное фенотипирование и показать соответствие между фенотипом КЛ и эпителиальными опухолевыми клетками МЖ.

Таблица 12. Определение уровня экспрессии клеточных маркеров в КЛ РМЖ.

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
СК 5/6	0	3	2	1
СК 14	3	3	3	0

3. Анализ химиочувствительности клеточных линий к лекарственным препаратам.

Анализу химиочувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам: актиномицину, таксолу, цисплатину - были подвергнуты две наиболее стабильно растущие КЛ: *CHEK2*-позитивная (C22 - *CHEK2* 1100delC+) и *NBS1*-позитивная (N5 - *NBS1* 657del5+).

КЛ С22 и N5, в отличие от линии В3, к моменту изучения химиочувствительности претерпели достаточно большое количество пассажей (21-й пассаж для КЛ С22, и 32-й пассаж для КЛ N5), что свидетельствует о высокой жизнеспособности КЛ. Именно поэтому, эти две линии были использованы в экспериментах по изучению химиочувствительности.

Лекарственная чувствительность КЛ оценивалась по интенсивности апоптоза в опухолевых клетках, который индуцировался действием актиномицина, таксола, цисплатина и регистрировался методом проточной цитометрии. На рисунках 13 и 14 приведены результаты действия цитостатических препаратов на клеточные линии С22 и N5. В качестве контроля использовали образцы, не подвергавшиеся действию химиопрепаратов. Рисунки 13 и 14 представляют собой диаграммы изменения количества жизнеспособных клеток при действии различных препаратов: А - контроль, Б - действие актиномицина, В - действие таксола, Г - действие цисплатина. Каждая диаграмма разбита на 4 области, соответствующие: 1 - жизнеспособным клеткам, 2 - клеткам раннего апоптоза, 3 - клеткам позднего апоптоза, 4 - некротическим клеткам. При проведении проточной цитометрии использовался краситель аннексин V, связывающий фосфолипиды мембраны клеток, которые уже на ранних стадиях апоптоза переносятся с внутренней поверхности плазматической мембраны на наружную.

Из рисунка 13 следует, что число апоптотических клеток на стадии раннего апоптоза КЛ С22 составляет при культивировании с актиномицином 11.58%, с таксолом - 10.3%, с цисплатином - 10.75%, по сравнению со значением апоптотических клеток 6.8% для контрольной КЛ. Такие же данные были получены на стадии позднего апоптоза: число апоптотических клеток при культивировании с актиномицином составило 35.83%, с таксолом - 41.73%, с цисплатином - 32.95%, по сравнению с контрольным образцом - 18.9%.

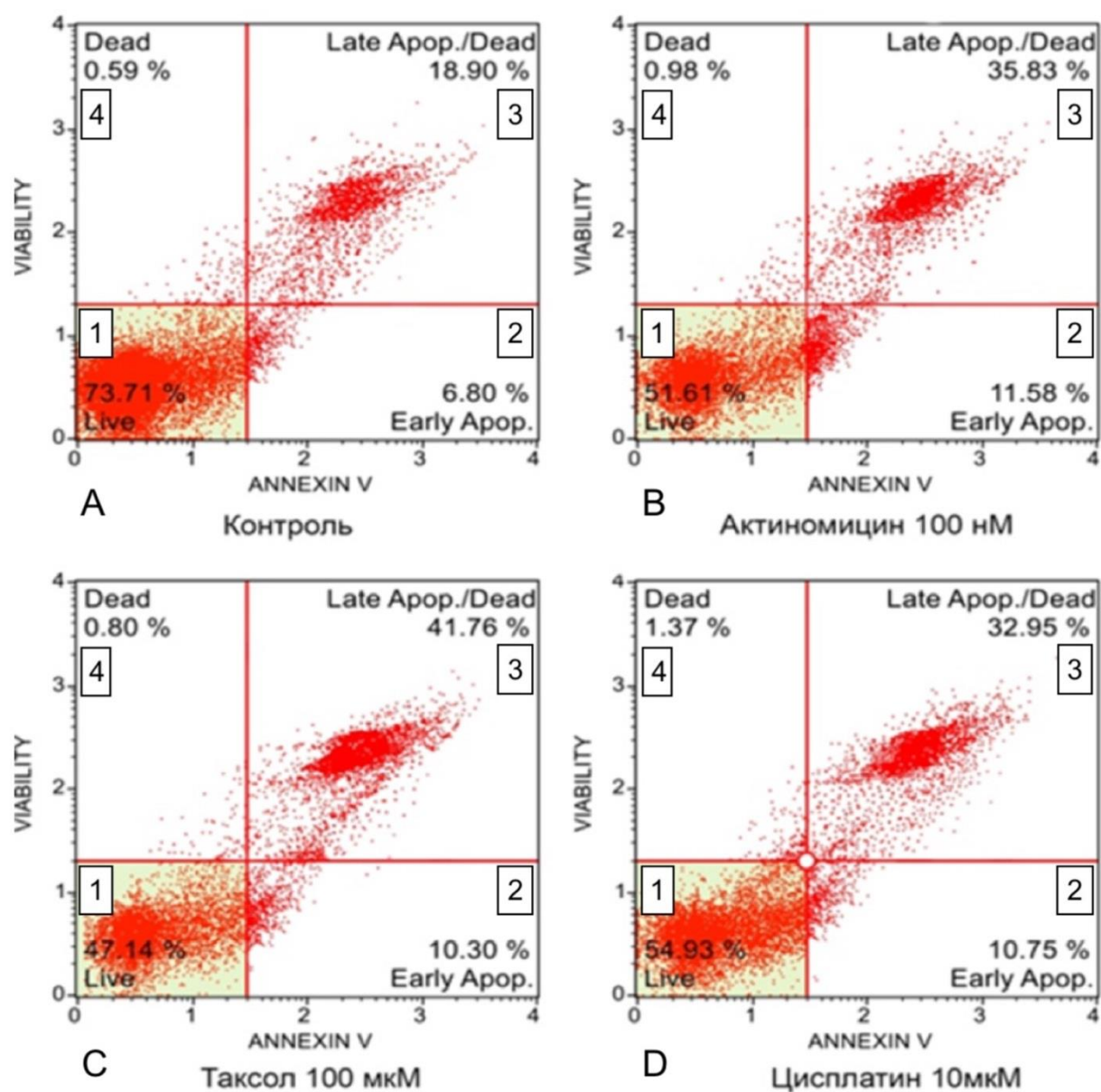


Рисунок 13. Оценка действия цитостатических препаратов на клеточную линию С22 методом проточной цитометрии.

- А - контроль;
- В - действие актиномицина;
- С - действие таксола;
- Д - действие цисплатина;
- 1 - жизнеспособные клетки;
- 2 - клетки раннего апоптоза;
- 3 - клетки позднего апоптоза;
- 4 - некротические клетки.

Таким образом, для линии С22 было отмечено в среднем двухкратное увеличение числа апоптотических клеток под воздействием каждого из химиопрепаратов (актиномицина, таксола, цисплатина) по сравнению с контролем, что свидетельствует о лекарственной чувствительности клеток данной линии.

На рисунке 14 показано, что число апоптотических клеток на стадии раннего и позднего апоптоза контрольной клеточной линии составило 3.94% и 10.12% соответственно. В экспериментальном образце для клеточной линии N5, при их культивировании 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.

Таким образом, для линии N5 значимого различия в числе апоптотических клеток до и после воздействия каждого препарата выявлено не было. Полученные результаты свидетельствуют о том, что клетки данной культуры имеют лекарственную устойчивость к актиномицину, таксолу и цисплатину.

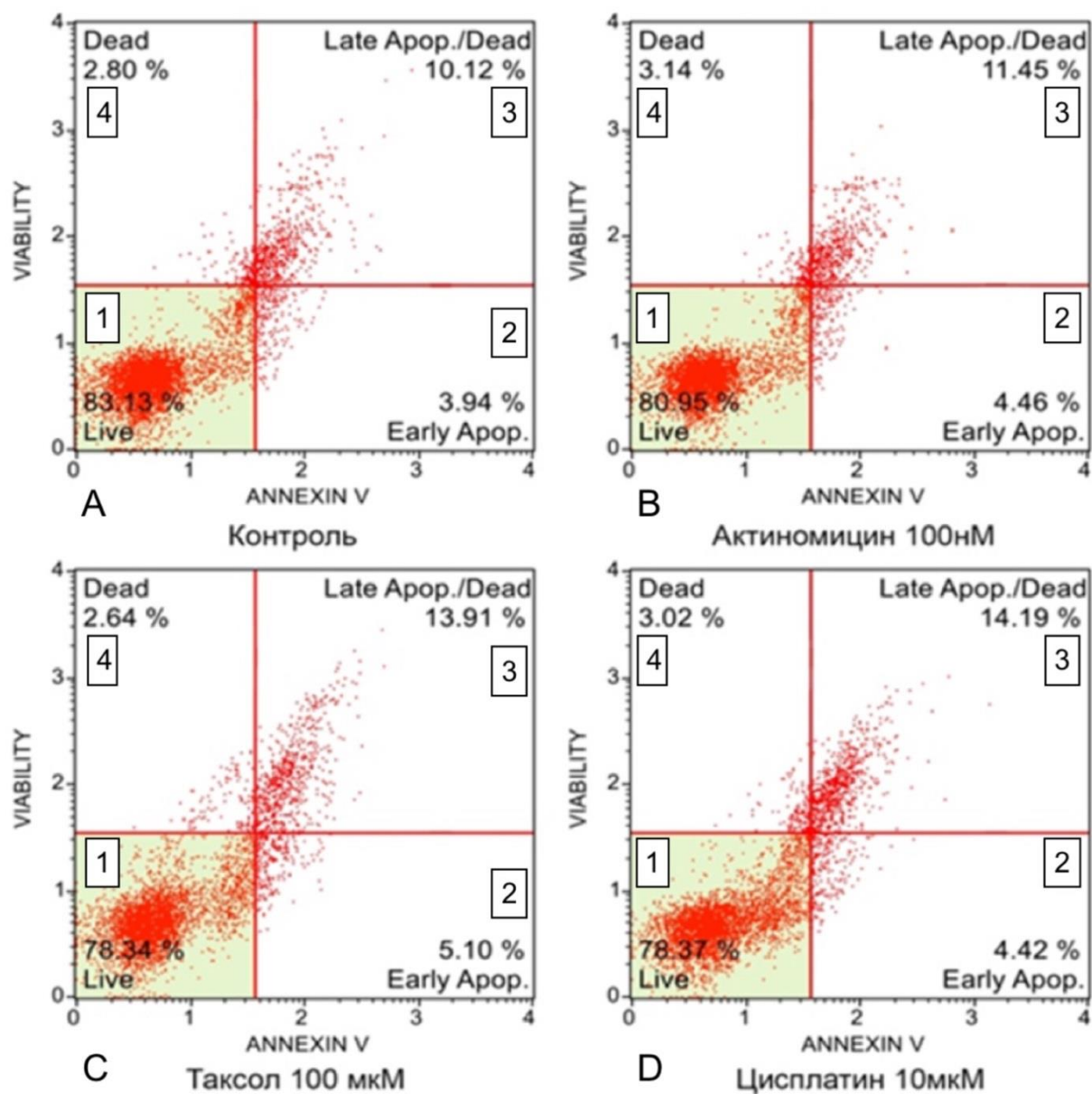


Рисунок 14. Оценка действия цитостатических препаратов на клеточную линию N5 методом проточной цитометрии.

- A - контроль;
- B - действие актиномицина;
- C - действие таксола;
- D - действие цисплатина;
- 1 - жизнеспособные клетки;
- 2 - клетки раннего апоптоза;
- 3 - клетки позднего апоптоза;
- 4 - некротические клетки.

III. Молекулярно-биологические и клинические особенности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных карцином молочной железы у пациенток.

Молекулярно-биологические и клинические особенности опухолевых клеток были исследованы на 78 (57 + 21) пациентках с наследственным РМЖ, включая 47 случаев *CHEK2*-опосредованных опухолей, 12 - *NBS1*-опосредованных опухолей и 19 - *BLM*-опосредованных опухолей. Контрольная группа для изучения клинико-биологических характеристик наследственного рака включала 107 пациенток со спорадическим РМЖ.

Результаты сравнения молекулярно-биологических и клинических характеристик наследственных и спорадических опухолей МЖ представлены в таблице 13. К клиническим показателям отнесены стандартные характеристики опухолей: возраст манифестации заболевания, размер и гистологический тип опухоли, вовлечение в патологический процесс регионарных лимфатических узлов. К молекулярно-биологическим характеристикам отнесены уровни экспрессии мембранных и ядерных рецепторов опухолевых клеток (ER, PgR, HER2).

Из таблицы 13 следует, что:

1. Средний возраст пациенток на момент манифестации заболевания оказался выше у носительниц мутаций в гене *CHEK2* (57.1 года), чем среди случаев спорадических опухолей (51.9 года) ($p = 0.02$, t-критерий Стьюдента), или чем у женщин-носительниц 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 молочной железы развиваются в более позднем возрасте, по сравнению с *NBS1*-, *BLM*-ассоциированными и спорадическими опухолями.

Таблица 13. Молекулярно-биологические и клинические особенности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных и спорадических карцином МЖ.

Параметр	Спорадический PMЖ	CHEK2+ PMЖ	NBS+ PMЖ	BLM+ PMЖ
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

*неспецифицированный рак;

**муцинозный, медуллярный, тубулярный, смешанный, секреторный формы рака, комедокарцинома.

2. У пациенток с мутациями в гене *CHEK2* реже наблюдались опухоли размером до 2 см в диаметре (T1) (*CHEK2* – 7/46, 15.2%), чем у пациенток со спорадическими случаями рака – 40/106, 37.7%) ($p = 0.007$, точный тест Фишера).

3. У пациенток с мутациями в гене *CHEK2* 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).

4. 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).

5. 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%), что позволяет определить молекулярный подтип рака.

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%).

IV. Анализ химиочувствительности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных карцином молочной железы у пациенток с неoadьювантным лечением.

Получены данные о результатах неoadьювантного лечения 30 пациенток с РМЖ, обусловленным мутациями в генах *CHEK2* (21 пациентка), *BLM* (6 пациенток) и *NBS1* (3 пациентки) и составляющих экспериментальную выборку - 2. Для сравнительной оценки химиочувствительности наследственных карцином МЖ была сформирована контрольная группа пациенток, состоящая из 105 протестированных женщин с известным результатом неoadьювантной терапии, негативных в отношении часто встречающихся мутаций генов наследственного РМЖ.

В таблице 14 указаны мутантные аллели генов наследственного РМЖ, статус рецепторов опухолевых клеток, возраст женщин, распространенность опухолевого процесса (в соответствии с классификацией TNM), примененная схема ХТ и ответ на лечение среди пациенток экспериментальной группы.

Таблица 14. Параметры *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ у пациенток, получавших неoadьювантную ХТ.

№	Мутация	Возраст	TNM	Статус рецепторов	Режим ХТ	Ответ
1	<i>CHEK2</i> 1100delC	39	T3N1M0	ER+/PgR+/HER2-	АТ (5)	ЧКО
2	<i>CHEK2</i> 1100delC	40	T2N2Mx	н/д	CMF (3) + RT, FDC (2)	ПЗ
3	<i>CHEK2</i> 1100delC	62	T4bN3M0	ER+/PgR+/HER2-	АТ (5)	СЗ
4	<i>CHEK2</i> 1100delC	43	T4bN1M0	ER+/PgR+/HER2+	Таксол + Герцептин (6)	ЧКО
5	<i>CHEK2</i> ivs2+1G>A	52	T4N0M0	ER-/PgR-/HER2+	Таксол + Герцептин (4), FEC + Герцептин (3)	ПКО

№	Мутация	Возраст	TNM	Статус рецепторов	Режим ХТ	Ответ
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 5395del	56	T4N2M0	ER+/PgR-/HER2+	Таксол + Герцептин (4), FEC + Герцептин (4)	ЧКО
11	CHEK2 5395del	32	T3N0M0	ER+/PgR+/HER2	FDC (2), Таксол (4)	ЧКО
12	CHEK2 5395del	45	T3N1M0	н/д	САФ (4)	ЧКО
13	CHEK2 5395del	72	T4N2Mx	ER-/PgR-/HER2-	ТС (4)	ЧКО
14	CHEK2 5395del	54	T4N1M0	ER-/PgR-/HER2+	ТАС (6), Герцептин (7)	ЧКО
15	CHEK2 5395del	50	T4bN3/2M0	ER+/PgR+/HER2-	FAC (8)	ЧКО
16	CHEK2 5395del	49	T4bN0M0	ER+/PgR+/HER2+	АТ (6)	ЧКО
17	CHEK2 5395del	56	T4bN2M0	ER+/PgR+/HER2+	Гормон-терапия	ЧКО
18	CHEK2 5395del	64	T2N2M0	ER+/PgR+/HER2+	FDC (5)	СЗ
19	CHEK2 5395del	51	T2N1M0	ER+/PgR+/HER2+	ТС (2)	ЧКО
20	CHEK2 5395del	31	T2N2M0	ER+/PgR+/HER2+	ТАС (4)	ЧКО
21	NBS1 657del5	35	T3N3M0	ER+/PgR+/HER2-	ТС (2), ТАС (4)	ПЗ

№	Мутация	Возраст	TNM	Статус рецепторов	Режим ХТ	Ответ
22	NBS1 657del5	49	T3N1M0	ER-/PgR-/HER2+	ТС + Герцептин (4)	ЧКО
23	NBS1 657del5	43	T2N0M0	н/д	FDC	ЧКО
24	BLM Q548X	58	T2N2M0	ER+/PgR+/HER2-	FAC	ПКО
25	BLM Q548X	52	T3N0M1	н/д	TAC (5)	ЧКО
26	BLM Q548X	48	T1N1M0	ER-/PgR-/HER2-	AT (6)	ЧКО
27	BLM Q548X	52	T1N0M0	ER+/PgR+/HER2-	AT (6)	ЧКО
28	BLM Q548X	41	T1N1M0	ER-/PgR-/HER2-	TAC (4) + RT	ЧКО
29	BLM Q548X	41	T3N2M0	н/д	TAC	ЧКО
30	BLM Q548X, CHEK2 5395del5	56	T4bN1M0	ER-/PgR-/HER2+	Таксол + FEC + Герцептин (8)	ЧКО

ЧКО - частичный клинический ответ;

ПЗ - прогрессирование заболевания;

СЗ - стабилизация заболевания;

ПКО - полный клинический ответ;

RT - радиотерапия;

н/д - нет данных.

При анализе химиочувствительности опухолей МЖ в опытную группу отбирались только те пациентки, которым назначались стандартные схемы неoadьювантной ХТ: безтаксановые химиотерапевтические режимы или таксан-содержащие режимы (с/без добавления препаратов антрациклинового ряда). Эффективность неoadьювантной терапии оценивалась по достижению у пациенток объективного клинического ответа (ОО) на проводимое противоопухолевое лечение. Доли пациенток в контрольной и экспериментальной группах, продемонстрировавших ОО при использовании стандартных схем ХТ, указаны в таблице 15.

В таблице 15 представлена контрольная группа, включающая 98 пациенток из 105, так как семи пациенткам были назначены нестандартные схемы ХТ или гормонотерапия. Из 98 женщин 18 человек получали лечение препаратами антрациклинов (без добавления препаратов таксанового ряда). Среди них доля ОО составила: ЧКО 15/18 (83.3%). У двоих женщин отмечалась стабилизация заболевания (СЗ) и еще у одной - прогрессирование заболевания (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) (Таблица 15). Еще у 8 женщин отмечалась СЗ. Среди всех женщин контрольной группы спорадического РМЖ частота ПКО составила 12/105 (11.4%) случаев.

Таблица 15. Частота объективного клинического ответа на неoadьювантную ХТ у пациенток в контрольной и экспериментальной 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%)	<i>p</i> = 0.418
СНЕК2+ опухоли (n=19) Доля ОО	n=14 13 (92,9%)	n=5 3 (60%)	<i>p</i> = 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	-

ОО - объективный ответ на проводимое лечение.

Эффективность неoadьювантной терапии СНЕК2-опосредованных опухолей была оценена у 20 пациенток из 21, поскольку 1 пациентка являлась носителем одновременно двух мутаций. Из 20 пациенток, 5 - получали лечение антрациклин-содержащими схемами без таксанов, и 14

пациенток - таксан-содержащую ХТ ($n = 19$) и одна больная получала гормонотерапию (поэтому результаты ее лечения не внесены в таблицу 15). Всего объективный ответ (ОО) на лечение был зафиксирован у 16 женщин из 19 (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) (Таблица 15). ПКО наблюдался у одной пациентки с *HER2*-экспрессирующей опухолью МЖ, получавшей антрациклины, таксаны и герцептин (гормональная терапия).

Кроме вышеописанных 20 случаев *CHEK2*-ассоциированного наследственного РМЖ, ответ на лечение был оценен еще у одной пациентки, которая оказалась носительницей сразу двух мутаций в генах *BLM* и *CHEK2* (*BLM* Q548X и *CHEK2* del5395). Ее ответ на лечение был приближен к ПКО, о чем свидетельствует полное исчезновение первичной опухоли (сT4bN1M0-rT0N1M0). Данные этой пациентки не были включены в анализ лекарственной чувствительности групп *CHEK2*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ.

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

У трех пациенток-носительниц мутаций в гене *NBS1* одна больная получала препараты из группы таксанов и герцептин, другая - находилась на лечении антрациклин-содержащими схемами ХТ и третья - получала препараты таксанового ряда. При этом у двух пациенток с разными режимами ХТ был зафиксирован частичный клинический ответ (ЧКО). У третьей пациентки с таксан-содержащими схемами ХТ отмечалось прогрессирование заболевания (ПЗ).

Глава 4

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена характеристике относительно новых разновидностей наследственного РМЖ в российской популяции, что имеет значение для разработки индивидуального подхода в лечении онкологических пациентов. Было проведено ретроспективно-проспективное исследование с использованием обширных групп пациенток (Рисунок 7). Все пациентки проходили лечение по поводу РМЖ на базе НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова в период с 2011 по 2017 года. В ходе работы получены новые данные касательно молекулярно-генетических и клинических особенностей наследственных форм РМЖ, обусловленных частыми мутациями в генах *CHEK2*, *NBS1* и *BLM*, распространенными в российской популяции (Таблица 13).

Анализ молекулярно-генетических и клинических параметров наследственных *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных карцином МЖ был проведен среди 78 пациенток. Из них большую часть составили женщины-носительницы мутаций в гене *CHEK2* (n = 47). *BLM*-ассоциированные карциномы были идентифицированы у 19 женщин и *NBS1*-ассоциированные карциномы - у 12 женщин.

Проведенный сравнительный анализ молекулярно-биологических и клинических характеристик наследственных и спорадических опухолей МЖ свидетельствует о наличии специфических особенностей *CHEK2*-опосредованного рака, а именно: развития заболевания в более позднем возрасте; повышенной доле распространения опухолей на кожу и грудную стенку (Т4); высокой частоте экспрессии рецепторов эстрогенов и меньшей частоте 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 МЖ [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].

Одной из известных характеристик наследственного рака является ранний возраст манифестации заболевания [Имянитов Е.Н., 2010]. Наблюдения данного исследования показывают, что *CHEK2*-опосредованные карциномы МЖ развиваются в более позднем возрасте по сравнению со спорадическими формами рака (57.1 vs. 51.9, $p = 0.02$, t-критерий Стьюдента). Средний возраст пациенток с *BLM*- и *NBS1*-ассоциированными карциномами существенно не отличался от спорадических случаев РМЖ.

Отличные от других форм РМЖ молекулярно-биологические и клинические характеристики *CHEK2*-опосредованных карцином МЖ могут влиять на лекарственную чувствительность данной категории наследственного рака. В связи с этим, при планировании терапии важное значение имеет генетическая идентификация часто встречающихся мутаций в гене *CHEK2* для разработки персонализированного подхода к лечению пациенток.

NBS1- и *BLM*-зависимые опухоли МЖ существенно не отличаются от спорадических карцином по большинству анализируемых параметров, за исключением молекулярно-биологического статуса экспрессии рецептора прогестерона. При *NBS1*- и *BLM*-зависимых опухолях, как и при *CHEK2*-ассоциированных карциномах, чаще наблюдалось отсутствие экспрессии PgR. Кроме того, по нашим наблюдениям *NBS1*-ассоциированные карциномы МЖ чаще экспрессируют рецепторы к эстрогенам, т.е. являются ER-

позитивными, что хорошо согласуется с данными литературы по исследованию молекулярно-биологических характеристик данной категории опухолей. [Bartkova J. Et al., 2008].

Индивидуальные молекулярно-биологические и клинические особенности *NBS1*- и *BLM*-ассоциированных опухолей важно учитывать при разработке персонализированного подхода к лечению у пациенток с РМЖ. Учитывая тот факт, что мутации в генах *NBS1* и *BLM* нередко встречаются среди женщин российской популяции, проведение генетического скрининга на предмет носительства онкоассоциированных мутаций также, как и при *CHEK2*-опосредованных опухолях МЖ, имеет важное клиническое значение для улучшения качества терапии и увеличения продолжительности жизни.

Впервые созданы КЛ *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного наследственного РМЖ, пригодные для исследования лекарственной чувствительности данных разновидностей опухолей МЖ. Для создания КЛ наследственного РМЖ у пациенток с подтвержденными мутациями в генах-интереса, не получавших неоадьювантной химиотерапии, были отобраны образцы опухолевой ткани. В ходе настоящей работы были отработаны протоколы перевивки опухолей МЖ в культуры клеток [Masters J.R.W., Palsson B., 1999; Kisselbach L. et al., 2009]. Первично было получено 30 КЛ, сохранивших свою пролиферативную активность. Однако, большая часть из создаваемых культур опухолевых клеток (20 клеточных линий из 30) со временем утратила пролиферативную активность, что согласуется с данными о сложности длительного культивирования клеток из первичных опухолей МЖ [Smith H.S. et al., 1984; Amadori D. et al., 1993; Gazdar A.F. et al., 1998; Pandrangi S.L. et al., 2014]. Утрата жизнеспособности значимой доли линий клеток в процессе исследования предполагает продолжение активного предоперационного скрининга пациенток для поиска носительных онкоассоциированных мутаций.

По причине гибели большинства КЛ, анализу химиочувствительности были подвергнуты только две линии клеток, которые на момент

исследования претерпели достаточно большое количество пассажиров: *CHEK2*-позитивная линия находилась на 21-м пассажe, *NBS1*-позитивная линия - на 32-м пассажe. Проведенные опыты по химиочувствительности КЛ показали пригодность данных линий к изучению спектра лекарственной чувствительности *CHEK2*-опосредованных и *NBS1*-опосредованных карцином МЖ.

С целью анализа лекарственной чувствительности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ были проанализированы данные результатов неoadьювантного лечения 30 пациенток. Сравнительный анализ результатов лечения позволяет сделать вывод о том, что у пациенток-носительниц мутаций в гене *CHEK2* неoadьювантная таксан-содержащая ХТ сопровождается большей частотой ОО, чем терапия на основе препаратов антрациклинового ряда. Меньшая чувствительность к антрациклин-содержащим схемам ХТ у *CHEK2*-опосредованных опухолей МЖ подтверждается другими исследованиями, касающимися химиочувствительности данной категории наследственного рака [Chrisanthar et al., 2008].

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 пациенток с 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.

Результаты настоящего исследования обосновывают возможность улучшения качества лечения данных категорий наследственного рака, за счет предварительного подбора терапевтических препаратов с наиболее эффективным лечебным потенциалом. Важной задачей дальнейших

исследований является анализ лекарственной чувствительности *CHEK2*-, *NBS1*- и *BLM*-ассоциированного РМЖ на больших выборках пациенток для получения статистически значимых результатов.

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 (T4) (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* неoadьювантная 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 неoadьювантную 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 неoadьювантном 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 неoadьювантной химиотерапии у пациенток с *CHEK2*-ассоциированными карциномами МЖ предпочтение стоит отдавать схемам, содержащим препараты из группы таксанов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гарбуков Е.Ю., Слонимская Е.М., Красулина Н.А., Дорошенко А.В., Кокорина Ю.Л. Неoadьювантная химиотерапия при раке молочной железы // Сибирский онкологический журнал. - 2005. - №2(14). - С. 63.
2. Двойрин В.В. Методика контролируемых клинических испытаний / В.В. Двойрин, А.А. Клименков. - М.: Медицина, 1985. - 143 с.
3. Заридзе Д.Г. Канцерогенез / Д.Г. Заридзе. - М.: Медицина, 2004. - 576 с.
4. Имянитов Е.Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая Онкология. - 2010. - №11(4). - С. 258-266.
5. Имянитов Е.Н. Общие представления о таргетной терапии // Практическая онкология. - 2010. - №3. - С. 123-130.
6. Имянитов Е.Н. Принципы индивидуализации противоопухолевой терапии // Практическая онкология. - 2013. - №14(4). - С. 187-194.
7. Имянитов Е.Н. Скрининг для лиц с наследственной предрасположенностью к раку // Практическая онкология. - 2011. - №11(2). - С. 102-109.
8. Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Молекулярная онкология: клинические аспекты / Е.Н. Имянитов, К.П. Хансон. - Спб.: СПбМАПО, 2007. - 210 с.
9. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. - 250 с.
10. Горбунова В.Н., Корженевская М.А., Анисимова Л.Е. и соавт. Генетика в клинической практике: руководство для врачей / В.Н. Горбунова, М.А. Корженевская. Спб.: СпецЛит, 2015. - 329 с.
11. Любченко Л.Н., Батенева Е.И. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной

предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников / Л.Н. Любченко, Е.И. Батенева. - М.: ИГ РОНЦ, 2014. - 75 с.

12. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Абрамов И.С. и соавт. Наследственный рак молочной железы и яичников // Журнал злокачественных опухолей. - 2013. - №2. - С. 53-61.

13. Майборода А.А. Молекулярно-генетические основы онкогенеза // Сибирский Медицинский Журнал - 2013. - №116(1). - С. 134-138.

14. Переводчикова Н.И., Портной С.М., Стенина М.Б., Анурова О.А. Гормонотерапия рака молочной железы / Н.И. Переводчикова, М.Б. Стенина. - М.: Практическая медицина, 2010. - 71 с.

15. Семиглазов В.Ф., Семиглазов В.В. Скрининг рака молочной железы // Практическая онкология. - 2010. - №11(2). - С. 60-65.

16. Семиглазов В.Ф. Эндокринотерапия раннего рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, Г.А. Дашян. - М.: МЕДпресс-информ, 2011. - 96 с.

17. Семиглазов В.Ф., Семиглазова Т.Ю., Божок А.А. и соавт. Неoadьювантная таргетная терапия рака молочной железы // Эффективная фармакотерапия. - 2013. - №6. - С. 12-16.

18. Семиглазов В.Ф. Рак молочной железы: мультидисциплинарный подход к лечению // Практическая онкология. - 2015. - №16(2). - С. 49-54.

19. Семиглазов В.Ф. Стратегические и практические подходы к решению проблемы рака молочной железы // Вопросы онкологии. - 2012. - №58(2). - С. 148-152.

20. Соколенко А.П. Что нужно знать о наследственном раке молочной железы и яичников / А.П. Соколенко, А.Г. Ивлева, Е.Н. Имянитов. - Спб.: Эко-Вектор, 2016. - 46 с.

21. Соколенко А.П., Розанов М.Е., Митюшкина Н.В. и соавт. Наследственные мутации при ранних, семейных и билатеральных формах рака молочной железы у пациенток из России // Сибирский Онкологический Журнал. - 2008. - №3(27). - С. 45-49.

22. Торопова Н.Е. и соавт. Молекулярно-генетические исследования в практике онкологической клиники // Известия Самарского научного центра РАН. - 2015. - №17(3). - С. 690-696.
23. Тюляндин С.А., Носов Д.А., Переводчикова Н.И. Минимальные клинические рекомендации Европейского общества медицинской онкологии (ESMO) / С.А. Тюляндин, Д.А. Носов, Н.И. Переводчикова. - М.: Издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2010. - 436 с.
24. Чиссов В.И., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2010 году / В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Г.В. Петрова. - М.: ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2010. - С. 188.
25. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии. - 2007. - №47. - С. 3-52.
26. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В.И. Юнкеров, С.Г. Григорьев. - СПб.: ВМедА, 2002. - 266 с.
27. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. Molecular Biology of the Cell // NY: Garland Science. - 2012. - 5th Ed. - P. 1205-1268.
28. Amadori D., Bertoni L., Flamigni A. et al. Establishment and characterization of a new cell line from primary human breast carcinoma // Breast Cancer Research and Treatment. - 1993. - Vol. 28(3). - P. 251-260.
29. Andrieu N., Goldgar D.E., Easton D.F. et al. Pregnancies, breast-feeding, and breast cancer risk in the International BRCA1/2 Carrier Cohort Study // Journal of the National Cancer Institute. - 2006. - Vol. 98(8). P. 535-544.
30. Antoniou A.C., Casadei S., Heikkinen T. et al. Breast Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2 // The New England Journal of Medicine. - 2014. Vol. 371(6). - P. 497-506.

31. Balmaña J., Diez O., Rubio I.T., Cardoso F. BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines // *Annals of Oncology*. - 2010. - Vol. 21. - P. 20-22.
32. Bartkova J., Tommiska J., Oplustilova L. et al. Aberrations of the MRE11-RAD50-NBS1 DNA damage sensor complex in human breast cancer: MRE11 as a candidate familial cancer-predisposing gene // *Molecular Oncology*. - 2008. - Vol. 2. - P. 296-316.
33. Bartlett J.M.S., Shaaban A., Schmitt F. // *Molecular Pathology: A Practical Guide for Surgical Pathologist and Cytopathologist*. - Cambridge: Cambridge University Press. - 2016. - P. 147-172.
34. Basakran N.S. CD44 as a potential diagnostic tumor marker // *Saudi Medical Journal*. - 2015. - Vol. 36(3). - P. 273-278.
35. Begum J., Day W., Henderson C. et al. A method for evaluating the use of fluorescent dyes to track proliferation in cell lines by dye dilution // *Cytometry Analysis*. - 2013. - Vol. 83(12). - P. 1085-1095.
36. Beretta G.L., Zunino F. Molecular mechanisms of Anthracycline activity // *Topics in current chemistry*. - 2008. - Vol. 283. - P. 1-19.
37. Bock G.H., Schutte M., Krol-Warmerdam E.M. et al. Tumor characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2*1100delC variant // *Journal of Medical Genetics*. - 2004. - Vol. 41(10). - P. 731-735.
38. Bogdanova N., Feshchenko S., Schürmann P. et al. Nijmegen Breakage Syndrome mutations and risk of breast cancer // *International Journal of Cancer*. - 2007. Vol. 122(4). - P. 802-806.
39. Buslov K.G., Iyevleva A.G., Chekmariova E.V. et al. NBS1 657del5 mutation may contribute only to a limited fraction of breast cancer cases in Russia // *International Journal of Cancer*. - 2005. - Vol. 114(4). - P. 585-589.
40. Byrski T., Gronwald J., Huzarski T. et al. Pathologic complete response rates in young women with BRCA-1 positive breast cancers after

neoadjuvant chemotherapy // *Journal of Clinical Oncology*. - 2010. - Vol. 28(3). - P. 375-379.

41. Cheang M.C.U., Chia S.K., Voduc D. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer // *Journal of National Cancer Institution*. - 2009. - Vol. 101(10). - P. 736-750.

42. CHEK2 Breast Cancer Case-Control Consortium. CHEK2 1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies // *American Journal of Human Genetics*. - 2004. - Vol. 74. - P. 1175-1182.

43. Chekmariova E.V., Buslov K.G., Iyevleva A.G. et al. CHEK2 1100delC mutation is frequent among Russian breast cancer patients // *Breast Cancer Research and Treatment*. - 2006. - Vol. 100. - P. 99-102.

44. Chrisanthar R., Knappskog S., Lokkevik E. et al. CHEK2 Mutations Affecting Kinase Activity Together with Mutations in *TP53* Indicate a Functional Pathway Associated with Resistance to Epirubicin in Primary Breast Cancer // *PLOS One*. - 2008. - Vol. 3(8). - P. e3062.

45. Chromic A.M., Daigeler A., Bulut D. et al. Comparative analysis of cell death induction by Taurolidine in different malignant human cancer cell lines // *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. - 2010. - Vol. 29. - P. 21.

46. Cybulski C., Huzarski T., Byrski T. et al. Estrogen receptor status in CHEK2-positive breast cancers: implications for chemoprevention // *Clinical Genetics*. - 2009. - Vol. 75(1). - P. 72-78.

47. Deans A.J., West S.C. DNA interstrand crosslink repair and cancer // *Nature Reviews Cancer*. - 2011. - Vol. 11(7). - P. 467-80.

48. De Bock G.H. Tumour characteristics and prognosis of breast cancer patients carrying the germline CHEK2*1100delC variant // *Journal of Medical Genetics*. - 2004. - Vol. 41(10). - P. 731-735.

49. Dent R., Warner E. Screening for hereditary breast cancer // *Seminars in Oncology*. - 2007. - Vol. 34. - P. 392-400.

50. Dong X., Liu A., Zer C. et al. siRNA inhibition of telomerase enhances the anti-cancer effect of doxorubicin in breast cancer cells // *BMC Cancer*. - 2009. - Vol. 9. - P. 133.
51. Dong X., Wang L., Taniguchi K. et al. Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk // *American Journal of Human Genetics*. - 2003. - Vol. 72. - P. 270-280.
52. Ebi H., Matsuo K., Sugito N. et al. Novel NBS1 heterozygous germ line mutation causing MRE11-binding domain loss predisposes to common types of cancer // *Cancer Research*. - 2007. - Vol. 67(23). - P. 11158-11165.
53. Ergul E., Sazci A. Molecular genetics of breast cancer // *Turkey Journal of Medical Science*. - 2001. - Vol. 31. - P. 1-14.
54. Ferla R., Calo V., Cascio S. et al. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes // *Annals of Oncology*. - 2007. - Vol. - 18(6). P. 93-98.
55. Fletcher O., Johnson N., Dos Santos Silva I. et al. Family history, genetic testing, and clinical risk prediction: pooled analysis of CHEK2 1100delC in 1,828 bilateral breast cancers and 7,030 controls // *Cancer Epidemiological Biomarkers Preview*. - 2009. - Vol. 18(1). - P. 230-234.
56. Gazdar A.F., Kurvari V., Virmani A. et al. Characterization of paired tumor and non-tumor cell lines established from patients with breast cancer // *International Journal of Cancer*. - 1998. - Vol. 78(6). - P. 766-774.
57. German J., Sanz M.M., Ciocci S., Ye T.Z., Ellis N.A. Syndrome-causing mutations of the BLM gene in persons in the Bloom's syndrome registry // *Human Mutations*. - 2007. - Vol. 28(8). - P. 743-753.
58. Gonzalez-Reymundez A. de Los Campos G., Gutierrez L., Lunt S.Y., Vasques A.I. Prediction of years of life after diagnosis of breast cancer using OMICs and OMIC-by-treatment interactions // *European Journal of Human Genetics*. - 2017. - Vol. 25. - P. 538-544.
59. Gorski B., Debniak T., Masoj B. et al. Germline 657del5 mutation in the NBS1 gene in breast cancer patients // *International Journal of Cancer*. - 2003. - Vol. 106. - P. 379-381.

60. Groep P., Wall E., Diest P.J. Pathology of hereditary breast cancer // Cellular Oncology. - 2011. - Vol. 34(2). - P. 71-88.
61. Hahne J.C., Schmidt H., Meyer S.R. et al. Anti-tumour activity of phosphoinositide-3-kinase antagonist AEZS 126 in models of triple-negative breast cancer // Journal of Cancer Research in Clinical Oncology. - 2013. - Vol.139(6). - P. 905-914.
62. Hanahan D., Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer // Cell. - 2000. - Vol. 100. - P. 57-70.
63. Harbeck N., Tomssen Ch., Gnant M. St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion // Breast Care (Basel). - 2013. - Vol. 8(2). - P. 102-109.
64. Havranek O., Kleiblova P., Hojny J. et al. Association of germline CHEK2 gene variants with risk and prognosis of non-Hodgkin lymphoma // PLOS One. - 2015. - Vol. 10(10). - P. e0140819.
65. Imyanitov E.N., Byrski T. Systemic treatment for hereditary cancers: a 2012 update // Hereditary Cancer in Clinical Practice. - 2013. - Vol. 11(1). - P. 2.
66. Iyevleva A.G., Imyanitov E.N. Cytotoxic and targeted therapy for hereditary cancers // Hereditary Cancer in Clinical Practice. - 2016. - Vol. 14(1). - P. 1-17.
67. Jaggupili A., Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity // Clinical and Developmental Immunology. - 2012. - 2012(1). - P. 1-11. doi: 10.1155/2012/708036.
68. Jiri B., Jiri L. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer // Cancer Cell. - 2003. - Vol. 3. - P. 421-429.
69. Kaufmann M. Recommendations from an international consensus conference on the current status and future of neoadjuvant systemic therapy in primary breast cancer // Annals in Surgical Oncology. 2012. - Vol. 19(5). P. 1508-1516.
70. Knudson A.G. Cancer genetics // American Journal of Medical Genetics. - 2002. - Vol. 111. - P. 96-102.

71. Knudson A.G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma // *Practical National Academic Science USA*. - 1971. - Vol. 68(4). - P. 820-823.
72. Knudson A.G. Two genetics hits (more or less) to cancer // *Nature Review in Cancer*. - 2001. - Vol. 1. - P. 157-162.
73. Kilpivaara O., Bartkova J., Eerola H. et al. Correlation of CHEK2 protein expression and c.1100delC mutation status with tumor characteristics among unselected breast cancer patients // *International Journal of Cancer*. - 2005. - Vol. 113(4). - P. 575-580.
74. Kisselbach L., Merges M., Bossie A., Boyd A. CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures // *Cytotechnology*. - 2009. - Vol. 59(1). - P. 31-44.
75. Kriege M. Survival and contralateral breast cancer in CHEK2 1100delC breast cancer patients: impact of adjuvant chemotherapy // *Breast Journal Cancer*. - 2014. - Vol. 111(5). - P. 1004-1113.
76. Krylova N.Yu., Ponomariova D.N., Sherina N.Yu. et al. CHEK2 1100delC mutation in Russian ovarian cancer patients // *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. - 2007. - Vol. 5(3). - P. 153-156.
77. Lalwani N., Prasad S.R., Vikram R. et al. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment // *Journal of Radiography*. - 2011. - Vol. 31. - P. 625-646.
78. Liedtke C. et al. Genomic profiling in triple-negative breast cancer // *Breast Care (Basel)*. - 2013. - Vol. 8(6). - P. 408-413.
79. Lynch H. et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology and management // *Molecular Oncology*. - 2009. - Vol. 3. - P. 97-137.
80. Lynch H.T., Casey M.J., Snyder C.L. et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology and management // *Molecular Oncology*. - 2009. - Vol. 3. - P. 97-137.

81. Lynch H.T., Snyder C., Lynch J.F. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation // *Annals of Surgical Oncology*. - 2012. - Vol. 19. - P. 1723-1731.
82. Makhoul I., Kiwan E. Neoadjuvant systemic treatment of breast cancer // *Journal of Surgical Oncology*. - 2011. - Vol. 103(4). P. 348-357.
83. Marchiò C., Reis-Filho J.S. Molecular diagnosis in Breast cancer // *Journal of Diagnostic Histopathology*. - 2008. - Vol. 14(5). - P. 202-213.
84. Masters J.R.W., Palsson B. // *Cancer Cell Lines: Human Cell Culter*. - Kluwer Academic Publishers. - 1999. - Vol. 1. - P. 283.
85. Mavaddat N., Antoniou A.C., Easton D.F., Garcia-Closas M. Genetic Susceptibility to Breast Cancer // *Molecular Oncology*. - 2010. - Vol. 4(3). - P. 174-191.
86. Meerloo J., Kaspers G.J., Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay // *Methods in Molecular Biology*. - 2011. - Vol. 731. - P. 237-245.
87. Meindl A., Ditsch N., Kast K. et al. Hereditary breast and ovarian cancer // *Deutsches Arzteblatt International*. - 2011. - Vol. 108(19). - P. 323-330.
88. Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1 // *Science*. - 1994. - Vol. 266(5182). - P. 66-71.
89. Mina L.A., Storniolo A.M., Kipfer H.D. et al. // *Breast Cancer Prevention and Treatment*. – Springer International Publishing Switzerland. - 2016. - P. 42-48.
90. Miyoshi Y. Topoisomerase IIalpha-positive and BRCA1-negative phenotype: association with favorable response to epirubicin-based regimens for human breast cancers // *Cancer Letters*. – 2008. - Vol. 264(1). - P. 44-53.
91. Moiseyenko V. M., Protsenko S.A., Brezhnev N.V. et al. High sensitivity of BRCA1-associated tumors to cisplatin monotherapy: report of two cases // *Cancer Genetics and Cytogenetics*. - 2010. - Vol. 197(1). - P. 91-94.

92. Nagel J.H., Peeters J.K., Smid M. et al. Gene expression profiling assigns CHEK2 1100delC breast cancers to the luminal intrinsic subtypes // *Breast Cancer Research and Treatment*. - 2012. - Vol. 132(2). - P. 439-448.
93. Narod S.A., Foulkes W.D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond // *Nature Reviews Cancer*. - 2004. - Vol. 4. - P. 665-676.
94. Nolan E. et al. Out-RANKing BRCA1 in mutation carriers // *Cancer Research*. - 2017. - Vol. 77(3). - P. 595-600.
95. Lalloo F., Evans D.G. Familial breast cancer // *Clinical Genetics*. - 2012. - Vol. 82(2). - P. 105-114.
96. Ojima I., Lichtenthal B., Lee S. et al. Taxane anticancer agents: a patient perspective // *Expert Opinion Therapy Patients*. - 2015. - Vol. 26(1). - P. 1-19.
97. Olsson E., Honeth G., Bendahl P.-O. et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers // *BMC Cancer*. – 2011. – Vol. 11. – P. 1-13. - doi: 10.1186/1471-2407-11-418.
98. Pabla N., Huang S., Mi Q.S. et al. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis // *The Journal of Biological Chemistry*. - 2008. - Vol. 283(10). - P. 6572-6583.
99. Pandrangi S.L., Raju Bagadi S.A., Sinha N.K. et al. Establishment and characterization of two primary breast cancer cell lines from young Indian breast cancer patients: mutation analysis // *Cancer Cell International*. - 2014. - Vol. 14(1). - P. 1-20. - doi:10.1186/1475-2867-14-14.
100. Seemanova E., Hoch J., Herzogova J. et al. Mutations in tumor suppressor gene NBS1 in adult patients with malignancies // *Casopis Lekaru Ceskych*. - 2006. - Vol. 145(3). - P. 201-203.
101. Schmidt M.K., Hogervorst F., Hien R. et al. Age- and Tumor Subtype-Specific Breast Cancer Risk Estimates for CHEK2*1100delC Carriers // *Journal of Clinical Oncology*. - 2016. - Vol. 34(23). - P. 2750-2760.

102. Schmidt M.K., Tollenaar R.A., Kemp S.R. et al. Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2*1100delC germline mutation // *Journal of Clinical Oncology*. - 2007. - Vol. 25(1). - P. 64-69.
103. Shao M.M., Chan S., Yu A., Lam C. et al. Keratin expression in breast cancers // *Virchows Archiv*. - 2012. - Vol. 461. - P. 313-322.
104. Shuen A.Y., Foulkes W.D. Inherited mutations in breast cancer genes - risk and response // *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. - 2011. - Vol. 16(1). - P. 3-15.
105. Silver D.P., Richardson A.L., Eklund A.C. et al. Efficacy of Neoadjuvant Cisplatin in Triple-Negative Breast Cancer // *Journal of Clinical Oncology*. - 2010. - Vol. 28(7). - P. 1145-1153.
106. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // *Science*. - 1987. - Vol. 235. - P. 177-182.
107. Smith H.S., Wolman S.R., Hackett A.J. The biology of breast cancer at the cellular level // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. - 1984. - Vol. 738(3). - P. 103-123.
108. Sokolenko A.P., Iyevleva A.G., Preobrazhenskaya E.V. et al. High prevalence and breast cancer predisposing role of the BLM c.1642 C>T (Q548X) mutation in Russia // *International Journal of Cancer*. - 2012. - Vol. 130(12). - P. 2867-2873.
109. Suspitsin E.N., Sherina N.Yu., Ponomariova D.N. et al. High frequency of BRCA1, but not CHEK2 or NBS1 (NBN), founder mutations in Russian ovarian cancer patients // *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. - 2009. - Vol. 10. - P. 86-97.
110. Turnpenny P. Ellard S. Emery's Elements of Human Genetics // UK: Churchill Livingstone. - 2009. - 13th Ed. - P. 196-212.

111. Vahteristo P., Bartkova J., Eerola H. et al. A CHEK2 Genetic Variant Contributing to a Substantial Fraction of Familial Breast Cancer // *American Journal of Human Genetics*. - 2002. - Vol. 71(2). - P. 432-438.
112. Voer R.M., Hahn M.-M., Mensenkamp A.R. et al. Deleterious Germline BLM Mutations and the Risk for Early-onset Colorectal Cancer // *Scientific Reports*. - 2015. - Vol. 5. - P. 1-7. - doi: 10.1038/srep14060.
113. Weischer M., Nordestgaard B.G., Pharoah P. et al. CHEK2*1100delC heterozygosity in women with breast cancer associated with early death, breast cancer-specific death, and increased risk of a second breast cancer // *Journal of Clinical Oncology*. - 2012. - Vol. 30(35). - P. 4308-4316.
114. Xing A.Y., Shi D.B., Liu W. et al. Restoration of chemosensitivity in cancer cells with MDR phenotype by deoxyribozyme, compared with ribozyme // *Experimental and Molecular Pathology*. - 2013. - Vol. 94(3). - P. 481-485.
115. Yarden Y., Ullrich A. EGF and erbB2 receptor overexpression in human tumors. Growth factor receptor tyrosine kinases // *Annual Review in Biochemistry*. - 1988. - Vol. 57. - P. 443-478.
116. Yarbro C.H., Wujcik D., Gobel B.H. // *Cancer Nursing: Principal and Practice*. // Jones and Bartlett Publishers. - 2011. - 7th Ed. - P. 135-168.
117. Zhang S., Phelan C.M., Zhang P. et al. Frequency of the CHEK2 1100delC mutation among women with breast cancer: an international study // *Cancer Research*. - 2008. - Vol. 68(7). - P. 2154-2157.