

ВЗАИМОСВЯЗЬ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОДТИПОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С КЛИНИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ ПАЦИЕНТОК

THE RELATIONSHIP OF MOLECULAR-BIOLOGICAL SUBTYPES OF BREAST CANCER WITH CLINICAL DATA OF PATIENTS

И. Н. Марчук, Е. М. Шпадарук, Р. М. Смолякова, Н. Н. Ахмед
I. Marchuk, K. Shpadaruk, R. Smolyakova, N. Ahmed

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
irishka14790@mail.ru
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

В ходе проведенного иммуногистохимического исследования были выявлены молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы по уровням экспрессии Her2/neu, Ki-67, ER, PR. Проведен статистический анализ взаимосвязи между молекулярно-биологическими подтипами рака молочной железы и клиническими данными пациенток.

In the course of the conducted immunohistochemical study, molecular biological subtypes of breast cancer were identified by the expression levels of Her2/neu, Ki-67, ER, PR. A statistical analysis of the relationship between molecular biological subtypes of breast cancer and the clinical data of the patients was carried out.

Ключевые слова: рак молочной железы, молекулярные маркеры, иммуногистохимический метод, молекулярные подтипы.

Keywords: breast cancer, molecular markers, immunohistochemical method, molecular subtypes.

Заболеемость раком молочной железы (РМЖ), несмотря на достигнутые за последние десятилетия успехи, остается серьезной медицинской и социальной проблемой во всем мире. В Республике Беларусь отмечается неуклонный рост числа заболевших: за последние 10 лет отмечено увеличение в 1,2 раза стандартизованного показателя заболеваемости и в 2016 г. он составил 50,8 на 100 000 женщин наряду со снижением смертности от данной патологии (12,5 на 100 000 женщин в 2016 г.), что связано с ухудшающейся экологической ситуацией в стране [1].

В связи с этим изучение гистологических и молекулярно-биологических особенностей опухоли, их влияние на непосредственные и отдаленные результаты лечения является актуальным [2].

На сегодняшний день для выбора оптимального метода терапии выделяют следующие клинические группы, соответствующие молекулярным подтипам РМЖ: **люминальный А** – рецепторы эстрогенов и прогестерона положительные, рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа (HER-2/neu) – отрицателен; **люминальный В** – рецепторы эстрогенов и прогестерона положительные, Her-2/neu – положителен; **Erb-B2 сверхэкспрессирующий** – рецепторы эстрогенов и прогестерона отрицательные, Her2/neu – положителен; **базальноподобный** – рецепторы эстрогенов и прогестерона отрицательные, Her-2/neu – отрицателен, что необходимо учитывать для прогноза течения заболевания и выборе тактики лечения пациенток [3].

Классификация экспрессий подтвердил тот факт, что разные подтипы РМЖ не просто имеют отличные друг от друга наборы молекулярных маркеров, но и характеризуются специфической биологией, прогнозом, а также предусматривают индивидуальный подбор терапии. Пациентки с люминальным А подтипом опухоли имеют самую длительную общую выживаемость; базальный и HER-2-позитивный подтип РМЖ характеризуется плохим прогнозом и наименьшей выживаемостью; люминальный В подтип опухоли занимает промежуточное место.

Известно, что молекулярные подтипы являются независимым прогностическим признаком и с высокой точностью предсказывает эффективность терапии [3].

Материалом для исследования послужили клинические данные и опухолевая ткань 150 пациенток, страдающих РМЖ, в возрасте от 33 до 79 лет, находившихся на лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова» с 2015 по 2018 гг.

Определение уровня экспрессии тканевых антигенов (Ki-67, Her-2/neu) и рецепторов стероидных гормонов пациенткам, страдающих РМЖ, осуществлялось иммуногистохимическим методом с применением реагентов ДАКО (Дания) с системой визуализации (EnVision+).

В ходе анализа клинических данных пациенток с РМЖ о степени распространенности опухолевого процесса было выявлено, что в общей анализируемой группе преобладала II стадия (45 %). Количество пациенток с раком молочной железы I стадии составило 17 %, II стадии – 45 % включающая IIA – 24 % и IIB – 21 %; III стадии – 29 % из которых, IIIA – 9 %, IIIB – 7 %, IIIC – 13 %; IV стадии – 7 % и в 2 % случаев диагностирован неинвазивный рак. При изучении морфологической характеристики заболевания было установлено, что наиболее часто встречаемый морфотип – инвазивный потоковый рак, который встречался у 71 % пациенток. Инвазивный дольковый

рак был обнаружен у 15 % пациенток. Количество пациенток со смешанным раком (протоково-дольковым) – 8 %, аденогенный и метастатический лишь по 1 %. Неинвазивный внутрипротоковый рак *in situ* встречается – 3 % и неинвазивный дольковый (лобулярный) рак – 1 %.

Для определения молекулярно-биологического подтипа РМЖ было проведено иммуногистохимическое исследование уровня экспрессии тканевых маркеров (эпидермального фактора роста типа 2 (HER-2/neu), пролиферативного антигена Ki-67, рецепторов эстрогенов и прогестерона).

Результаты проведенных исследований показали, что у 42 (28 %) пациенток, страдающих раком молочной железы, высокая экспрессия ER и 24 (16 %) пациентки оказались с высокой экспрессией PR (табл. 1).

Таблица 1 – Иммуногистохимическое исследование ER и PR у пациенток, страдающих РМЖ

Рецепторы	Негативные опухоли		Позитивные опухоли (%)						Всего	
	0–10		10–40		40–85		85–100			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ER	50	33	20	14	38	25	42	28	150	100
PR	82	55	14	9	30	20	24	16	150	100

При оценке у пациенток уровня экспрессии рецепторов эстрогенов из всех позитивных опухолей молочной железы установлено, что у 28 % пациенток выявляются опухоли, имеющие высокий уровень данных рецепторов (85–100 % положительных клеток) и 25 % опухолей, имеющие умеренный уровень экспрессии рецепторов эстрогенов (40–85 % клеток). Общий процент эстроген-негативных опухолей, т. е. содержащих 0–10 % иммуноокрашенных клеток, составил 33 %.

При определении у пациенток уровня экспрессии рецепторов прогестерона из всех позитивных опухолей молочной железы установлено, что у 16 % пациенток выявляются опухоли, имеющие высокий уровень данных рецепторов (85–100 % положительных клеток) и 20 % опухолей, имеющие умеренный уровень экспрессии рецепторов прогестерона (40–85 % клеток). Прогестерон-негативными оказались 55 % исследуемых опухолей.

Таким образом, при анализе полученных данных было выявлено, что эстроген-нечувствительными являются 33 % пациенток, а прогестерон-негативных оказались 55 % пациенток с РМЖ, что может быть ассоциировано с неблагоприятным прогнозом течения заболевания.

При определении уровня экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона было установлено, что у 54 (36 %) пациенток с низким уровнем ER и PR (0–10 %) преобладала IIA стадия опухолевого процесса, а у 28 % (54) пациенток, с гиперэкспрессией ER и PR (85–100 %) преобладает IIB стадия опухолевого процесса.

В проведенном исследовании отсутствие экспрессии Her-2/neu составляет 35 % случаев заболевания, в 25 % случаев заболевания, наблюдался низкий уровень экспрессии (score 1+), у 17 % наблюдался умеренный уровень экспрессии (score 2+), и в 23 % случаев заболевания обнаружена гиперэкспрессия (score 3+) в опухолевых тканях пациенток.

Согласно полученному исследованию, избыточная экспрессия HER-2/neu (score 2+ и score 3+) обнаружена у 40 % пациенток, страдающих РМЖ. В связи с этим, выявление HER-2/neu может служить независимым маркером неблагоприятного прогноза, повышенного риска рецидива заболевания.

Чрезвычайно важным являлось определение маркеров пролиферации отражающих пролиферативную активность, как фактор злокачественной трансформации клетки, так и признак агрессивного поведения уже развившихся опухолей. Среди них первое место занимает антиген Ki-67, экспрессирующийся во всех фазах митотического цикла. На основании многочисленных исследований установлено, что индекс пролиферации в самых разных опухолях является независимым прогностическим фактором, определяющим вероятность возникновения рецидива, общую и безрецидивную выживаемости [3].

Все пациентки, страдающие РМЖ были разделены на группы в зависимости от уровня экспрессии Ki-67. В 1-й группе пациенток отмечена экспрессия Ki-67 от 0 до 10 %, во 2-й группе пациенток – 10–30 %, в 3-й группе пациенток – 30–50 %, в 4-й группе пациенток установлен уровень экспрессии Ki-67 свыше 50 %.

В ходе проведенного исследования отсутствие экспрессии тканевого антигена Ki-67 составляет 25 % случаев, в 30 % случаев выявлен низкий уровень экспрессии, в 24 % – наблюдается умеренный уровень экспрессии, и в 21 % случаев обнаружена гиперэкспрессия антигена Ki-67 в опухолевых тканях пациенток.

При анализе исследования получено, что у 15 (10 %) пациенток с высоким уровнем экспрессии HER-2/neu (score 2+ и score 3+) и высокой пролиферативной активностью опухоли (Ki-67 50 %>), преобладали IIB и IV стадии опухолевого процесса, что диагностически отражает высокую степень инвазивного потенциала опухоли и неблагоприятного прогноза.

По результату иммуногистохимического исследования были выделены молекулярные подтипы РМЖ.

В результате полученных данных обнаружено что люминальный А тип выявлен у 81 (54 %) пациенток с РМЖ, люминальный В – у 24 (16 %) пациенток с РМЖ, HER-2+ – у 33 (22 %) пациенток с РМЖ, базальноподобный – у 12 (8 %) пациенток с РМЖ.

Результаты исследования показали, что Люминальный А тип, характеризующийся высоким уровнем экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, низкой (до 14 %) пролиферативной активностью и низкой степенью дифференцировки (G3), детектирован у 54 % пациенток и является наиболее благоприятной формой РМЖ.

В анализируемой группе пациенток с установленным *люминальным А* типом преобладает инвазивный потоковый рак – выявленный у 64 % пациенток, инвазивный дольковый у 21 %. Количество пациенток со смешанным раком (протоково-дольковым) составляет – 11 % случаев, неинвазивный внутрипротоковый рак *in situ* встречается в 4 % случаев. В результате анализа степени распространенности опухолевого процесса было установлено, что I стадия верифицирована у 22 % пациенток. Количество пациенток со II стадией составляет – 41 % случаев (IIА – 21 % и IIВ – 20 %); III стадией – 26 % (IIIА – 10 %, IIIВ – 9 %, IIIС – 7 %); IV стадией – 9. В 2 % случаев диагностирован неинвазивный рак.

Люминальный В тип, характеризующийся низким содержанием уровня экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, высокой пролиферативной активностью (Ki67 > 14 %) и высокой степенью дифференцировки (G1), выявлен у 16 % пациенток. При анализе морфотипа пациенток с установленным *люминальным В* типом РМЖ преобладал инвазивный потоковый рак выявленный у 63 % пациенток, инвазивный дольковый у 25 %. Количество пациенток со смешанным раком (протоково-дольковым) составляет – 4 % случаев, неинвазивный внутрипротоковый рак *in situ* встречается в 8 % случаев. В ходе исследования степени распространенности опухолевого процесса с данным молекулярно-биологическим типом опухоли было установлено, что I стадия верифицирована у 42 % пациенток. Количество пациенток со II стадией составляет – 29 % случаев (IIА – 12 % и IIВ – 17 %); III стадией – 17 % (IIIА – 13 %, IIIВ – 4 %); IV стадией – 4 %. В 8 % случаев диагностирован неинвазивный рак.

Erb-B2 сверхэкспрессирующий тип составляет 22 % всех исследуемых случаев РМЖ. В зависимости от морфологического типа опухоли молочной железы в анализируемой группе пациенток с установленным HER-2+ сверхэкспрессирующим типом РМЖ наиболее часто встречается инвазивный потоковый рак у 81 % пациенток, инвазивный дольковый у 7 %. Количество пациенток со смешанным раком (протоково-дольковым) составляет – 5 % случаев, неинвазивный внутрипротоковый рак *in situ* встречается в 7 % случаев. При анализе степени распространенности опухолевого процесса было установлено, что у 27 % пациенток верифицирована II стадия и IIIС (24 %) стадия опухолевого процесса. Количество пациенток с I стадией составляет – 9 % случаев, II стадией – 45 % (IIА – 18 % и IIВ – 27 %); III стадией – 39 % (IIIА – 3 %, IIIВ – 12 %, IIIС – 24 %) и в 7 % случаев преобладает IV стадия опухолевого процесса.

Базальноподобный тип обнаружен у 8 % пациенток с РМЖ. В ходе оценки морфотипа пациенток с установленным базальноподобным типом РМЖ преобладает инвазивный потоковый рак, выявленный у 75 % пациенток, инвазивный дольковый у 17 %. Неинвазивный внутрипротоковый рак *in situ* встречается у 8 % случаев. При анализе степени распространенности опухолевого процесса было установлено, что у 33 % пациенток верифицирована II стадия и IIIС (25 %) стадия опухолевого процесса. Количество пациенток с I стадией составляет – 17 % случаев, II стадией – 41 % (IIА – 33 % и IIВ – 8 %); III стадией – 42 % случаев (IIIА – 17 % и IIIС – 25 %). Эти типы опухоли прогностически менее благоприятны и ассоциируются с агрессивным течением заболевания.

В результате анализа данных была проведена оценка корреляционной взаимосвязи между молекулярными подтипами РМЖ и клиническими данными пациенток, страдающих РМЖ.

Анализ взаимосвязи между молекулярными подтипами и клиническими данными проводился с использованием корреляционного анализа по Спирмену. При выполнении математической обработки данных приняты следующие пороговые значения коэффициентов корреляции: $R_s < 0,3$ – слабая связь, от 0,3 до 0,49 – корреляционная связь умеренной силы, от 0,5 до 0,69 – корреляционная связь средней силы, $R_s > 0,7$ – сильная корреляционная зависимость [4].

При детектированном *люминальном А* типе имеется прямопропорциональная связь слабой силы со стадией распространенности опухолевого процесса и степенью дифференцировки опухоли ($R_s = 0,25$, $p_{\text{Спирмен}} < 0,05$). При установленном *Люминальном В* подтипе анализ данных показал, что имеется прямая взаимосвязь средней силы ($R_s = 0,5$, $p_{\text{Спирмен}} < 0,05$) между молекулярным подтипом, степенью дифференцировки опухоли и стадией распространенности опухолевого процесса. При анализе взаимосвязи между молекулярными типами и морфотипами опухоли статистической связи не было выявлено ($p_{\text{Спирмен}} > 0,05$).

В ходе статистического анализа базальноподобного и сверхэкспрессирующего подтипов, было установлено, что статистически значимых связей не выявлено.

Таким образом, определение молекулярно-биологического профиля РМЖ на основе экспрессии исследуемых маркеров позволит понять пролиферативный статус опухоли, предопределить прогноз заболевания и индивидуализировать тактику лечения.

В ходе молекулярно-биологического исследования было выявлено, что при *люминальном А* типе преобладала II стадия опухолевого процесса у 41% пациенток, с низкой степенью дифференцировки (G3), ($p_{\text{Спирмен}} < 0,05$), *люминальном В* типе преобладала I стадия опухолевого процесса у 42 % пациенток, с высокой степенью дифференцировки (G1), ($p_{\text{Спирмен}} < 0,05$), *Erb-B2 сверхэкспрессирующем* типе – II (45 %) стадия опухолевого процесса, *базальноподобном* типе – III (42 %) стадия опухолевого процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аверкин, Ю. И. Алгоритмы диагностики и лечения больных злокачественными новообразованиями / Ю. И. Аверкин, Н. Н. Антоненкова [и др.] / под ред. И. В. Залуцкого, Э. А. Жаврида. – Минск, 2007. – С. 248–254.
2. Герштейн, Е. С. Тканевые маркеры как факторы прогноза при раке молочной железы / Е. С. Герштейн [и др.] // Практическая онкология / под ред. С. А. Тюляндина, В. М. Моисеенко. – СПб: Центр ТОММ, 2004. – С. 41–50.

3. *Имянитов, Е. Н.* Молекулярная онкология: клинические аспекты / Е. Н. Имянитов, К. П. Хансон. – СПб., 2007. – 211 с.

4. *Ефимова, М. Р.* Практикум по общей теории статистики: учебное пособие для вузов / М. Р. Ефимова и др. – М.: Финансы и статистика, 2007. – 368 с.

АССОЦИАЦИЯ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ МЕВАЛОНАТНОГО ПУТИ С ОТВЕТОМ НА БИСФОСФОНАТНУЮ ТЕРАПИЮ ОСТЕОПОРОЗА ASSOCIATION OF ALLELIC VARIANTS OF MEVALONATE PATHWAY GENES WITH RESPONSE TO BISPHOSPHONATE THERAPY OF OSTEOPOROSIS

***П. М. Морозик^{1,2}, Е. В. Кобец², Э. В. Руденко³
P. Marozik^{1,2}, K. Kobets², E. Rudenko³***

¹*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь*

²*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, г. Минск, Республика Беларусь*

³*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь
MarozikPM@bsu.by*

¹*Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

²*Institute of Genetics and Cytology of the NAS Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

³*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

Бисфосфонаты (БФ) являются наиболее часто назначаемым препаратом пациентам с остеопорозом (ОП). Для некоторых пациентов такое лечение неэффективно по причине индивидуальной устойчивости. Провести оценку уровня минеральной плотности костной ткани по результатам терапии БФ возможно не ранее чем через год. Выявление генетических факторов, ответственных за устойчивость к лечению БФ, позволит заблаговременно оптимизировать и повысить эффективность лечения. Целью исследования являлось проанализировать ассоциацию вариантов генов, участвующих в метаболизме костей и лекарственных препаратов, с ответом на терапию БФ. Показано, что частота генотипов *SOST* T/T, *PTH* T/T, *FDPS* G/G, *GGPSI* T/T статистически значимо выше в группе неответчиков на лечение ($P < 0,05$). Анализ ассоциации аллельных комбинаций выявил варианты, статистически значимо повышающие (T-T-G-C) и снижающие (C-C-T-C) риск устойчивости к БФ.

Bisphosphonates (BPs) are the most commonly prescribed medications in patients with osteoporosis (OP). However, in some patients this therapy is not effective due to the individual resistance. The evaluation of poor bone mineral density (BMD) response to BPs treatment is possible no earlier than a year. The identification of genetic factors, responsible for resistance to BPs therapy, may enable drug therapy optimization and more effective treatment. The aim of this study was to analyze the association of bone and drug metabolism gene polymorphisms on the response to BPs treatment of OP. We found that *SOST* T/T, *PTH* T/T, *FDPS* G/G, *GGPSI* T/T genotypes were significantly over-represented in non-responders ($P < 0.05$). Further multiple analysis of their association with response to BPs therapy revealed allelic combination of increased (T-T-G-C) and decreased (C-C-T-C) risk of BPs resistance.

Ключевые слова: фармакогенетика, остеопороз, полиморфизм, антирезорбтивная терапия, бисфосфонаты.

Keywords: pharmacogenetics, osteoporosis, polymorphism, antiresorptive therapy, bisphosphonates.

Остеопороз (ОП) – тяжелое поражение скелета, характеризующееся снижением минеральной плотности костной ткани (МПКТ), патологическими изменениями ее микроархитектоники, приводящими к деформации и повышенной ломкости костей. ОП занимает четвертое место среди важнейших причин заболеваемости и смертности пожилых людей [1]. Во многих странах мира зарегистрировано увеличение частоты переломов, связанных с ОП. Каждое десятилетие их число увеличивается примерно на 40 %. Актуальность проблемы остеопороза определяется его широкой распространенностью, многофакторной природой, частой инвалидизацией пациентов, а в ряде случаев смертельными исходами [1; 2].

ОП относится к комплексным дегенеративным заболеваниям, требующим долгосрочного фармакологического лечения. В связи с этим, особенно важно, чтобы назначенные медикаменты были эффективными и не вызывали серьезных побочных эффектов, улучшая качество жизни пациента и снижая заболеваемость, риск осложнений, смертность и стоимость расходов на здравоохранение. Индивидуальный ответ на лекарственный препарат определяется многими факторами, такими как пол, возраст, этническая принадлежность, стадия заболевания,