

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет  
физико-математических  
и естественных наук

Кафедра  
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

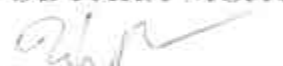
Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ  
МАРКЕРОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ»

Студент



Городнова Марина Юрьевна

Руководитель



Кручинина А.Д.

Рецензент



Дружинина Т.А.

Нормоконтролер



Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 14.06.22 № 13 )

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 22.06.22 № 1 )

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

|                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ВВЕДЕНИЕ.....                                                                                                                                                                                      | 3  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....                                                                                                                                                                    | 5  |
| 1.1 Рак молочной железы .....                                                                                                                                                                      | 5  |
| 1.1.1 Этиология и патогенез.....                                                                                                                                                                   | 6  |
| 1.1.2 Эпидемиология и факторы риска .....                                                                                                                                                          | 8  |
| 1.2 Морфологические формы РМЖ .....                                                                                                                                                                | 14 |
| 1.3 Молекулярно-генетическая классификация РМЖ .....                                                                                                                                               | 16 |
| 1.4 Лекарственная терапия при РМЖ. ....                                                                                                                                                            | 22 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....                                                                                                                                                      | 25 |
| 2.1 Материалы исследований.....                                                                                                                                                                    | 25 |
| 2.2 Методы исследований .....                                                                                                                                                                      | 25 |
| 2.2.2. Морфологический метод.....                                                                                                                                                                  | 25 |
| 2.2.3. Иммуногистохимический метод.....                                                                                                                                                            | 27 |
| 2.2.4. Молекулярно-генетический метод.....                                                                                                                                                         | 31 |
| 2.2.5. Статистический анализ.....                                                                                                                                                                  | 37 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....                                                                                                                                              | 38 |
| 3.3.1 Результаты анализа результатов определения белка Her2, с<br>последующим уточнением статуса гена Her2/neu методом FISH у пациенток с<br>неопределенным ИГХ-статусом рака молочной железы..... | 38 |
| 3.3.2. Анализ мутационного статуса генов BRCA1/2 методом ПЦР у<br>пациентов с РМЖ .....                                                                                                            | 48 |
| 3.3.3 Анализ мутационного статуса генов PIK3CA методом ПЦР у пациентов<br>с РМЖ.....                                                                                                               | 53 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....                                                                                                                                                                                   | 57 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....                                                                                                                                                                             | 59 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....                                                                                                                                                                             | 60 |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы.

Рак молочной железы является наиболее распространенным среди онкологических заболеваний у женщин. Заболеваемость с каждым годом растет. Смертность от рака молочной железы достаточно высока.

Хирургическое вмешательство остается основным методом лечения. Однако существуют и другие варианты лечения рака молочной железы такие, химиотерапия, лучевая терапия и гормональная терапия [18]. Выбор терапии зависит от стадии, а также от гистологических и молекулярных подтипов.

Большинство случаев рака молочной железы относится к инвазивному типу. Эти злокачественные новообразования распространились за пределы протоков и желез в окружающие ткани и лимфатические узлы. В настоящее время существует 21 гистологически отличный рак молочной железы и четыре различных молекулярных варианта. Каждый подтип отличается общей картиной и типом необходимого лечения. Инвазивные злокачественные новообразования оцениваются с помощью молекулярных методов, чтобы определить наличие гормональных рецепторов и чрезмерную концентрацию рецептора эпидермального фактора роста человека.

Большинство инвазивных злокачественных новообразований молочной железы являются эстрогенными или положительный по рецептору прогестерона, но отрицательный по рецептору эпидермального роста человека. Эти злокачественные новообразования характеризуются медленным ростом и менее агрессивны [25]. Это контрастирует с тройным негативным раком, который имеет самый неблагоприятный краткосрочный прогноз, в основном из-за отсутствия таргетной терапии. Злокачественные новообразования молочной железы, отрицательные по гормональным рецепторам, но положительные по рецептору человеческого эпидермального фактора роста, также более агрессивны и имеют более плохой краткосрочный прогноз, чем гормоноположительные типы.

Выживаемость зависит от стадии диагноза. Показатели выживаемости самые высокие на ранних стадиях диагностики по сравнению с поздними стадиями.

**Целью работы** является анализ биохимических и молекулярно-генетических маркеров рака молочной железы

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

1) Проанализировать и обобщить российский и зарубежный опыт по изучению биохимических и молекулярно-генетических маркеров рака молочной железы.

2) Анализ результатов определения белка Her2, с последующим уточнением статуса гена Her2/neu методом FISH у пациенток с неопределенным ИГХ-статусом рака молочной железы

3) Анализ мутационного статуса генов BRCA1/2 методом ПЦР у пациентов с РМЖ

4) Анализ мутационного статуса генов PIK3CA методом ПЦР у пациентов с РМЖ

Магистерская диссертация написана на 65 листах, содержит 31 рисунок, 9 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 60 источников.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Рак молочной железы

Рак молочной железы – это общий термин для набора подтипов опухоли молочной железы с различным молекулярным и клеточным происхождением и клиническим поведением. Большинство из них представляют собой эпителиальные опухоли протокового или долькового происхождения. Во всем мире рак молочной железы является наиболее часто диагностируемым опасным [7] для жизни раком у женщин и основной причиной смерти от рака среди женщин.

Молочная железа является органом-мишенью для 18 ныне известных гормонов. Она реагирует на все изменения в сложной системе гипоталамус-гипофиз-яичники. Наиболее существенное и прямое влияние на нее оказывают женские половые гормоны – эстроген, прогестерон и пролактин.

Ткань молочной железы состоит из долек, которые представляют собой железы, участвующие в выработке молока, протоков, соединяющих дольки с соском, и соединительной ткани, жировой ткани и лимфатической ткани. Рак молочной железы возникает при нерегулируемом росте клеток в любом из компонентов молочной железы, хотя чаще всего это происходит в дольках [19].

Хотя рак молочной железы встречается значительно реже, он также может встречаться у мужчин. Рак молочной железы развивается с течением времени и может пройти фазу *in situ*. Будь то *in situ* или инвазивный, он может быть обнаружен во время обычного самостоятельного осмотра груди, маммографического скрининга или при появлении признаков или симптомов [39]. Первоначально нет никаких признаков или симптомов, связанных с раком молочной железы, до тех пор, пока в груди не появится пальпируемое или видимое уплотнение. Наиболее распространенным физическим признаком, который можно оценить, является безболезненная опухоль в груди. Опухшие и увеличенные лимфатические узлы могут присутствовать в подмышечной области на ранних стадиях метастазирования.

Хирургия и лучевая терапия, наряду с адъювантной гормональной или химиотерапией, при наличии показаний, считаются основным лечением. Хирургическое лечение может состоять из лампэктомии или тотальной мастэктомии [15]. Лучевая терапия может следовать за хирургическим вмешательством с целью искоренения остаточной болезни при одновременном снижении частоты рецидивов.

### 1.1.1 Этиология и патогенез

Современная теория канцерогенеза протоонкогенов-онкогенов-антионкогенов находит реальное подтверждение в механизмах развития рака молочной железы, о чем свидетельствует экспрессия на мембранах малигнизированных клеток онкобелков, в частности, рецепторных белков к эстрогенам, прогестерону, соматостатину, к эпидермальному и инсулиноподобным факторам роста, к цитокинам и другим соединениям различной функциональной значимости [9, 17]. На сегодняшний день известным является тот факт, что при слишком сильной экспрессии онкобелков-переключателей клеточного цикла в случае трансформации протоонкогена PRAD1 в онкоген, и некоторых других онкогенов, например, *erb B*, *myc*, *myb*, *H-ras*, *N-ras*, *K-ras* возникает рак молочной железы. При развитии агрессивных опухолей молочной железы, которые не имеют стероидных рецепторов, выявлена амплификация и усиленная экспрессия ряда онкогенов, что говорит о неблагоприятном прогностическом исходе [1]. В первичных опухолях молочной железы чаще всего возникают мутации и экспрессия трех онкогенов *Her2/neu*, *C-myc*, *Int-2*, а также в супрессорных генах – гене *P53* и гене ретинобластомы *RB*.

Сложное взаимодействие ряда гормонов и факторов роста обеспечивают нормальные рост и развитие молочной железы. Клетки молочной железы способны сами секретировать некоторые гормоны, поэтому могут выполнять аутокринные функции, а малигнизированные клетки МЖ экспрессируют рецепторы многих полипептидных факторов и



### 1.1.2 Эпидемиология и факторы риска

Во всем мире рак молочной железы является как наиболее распространенным видом рака (Рис.2, 3). Заболеваемость и смертность в странах с высоким уровнем жизни снижается, тогда как заболеваемость и смертность в странах с низкими уровнем растут (Рис.4, 5). Вероятно, это связано с разными факторами риска и различиями в доступе к раннему выявлению и лечению рака молочной железы.



Рисунок 2. Карта заболеваемости раком молочной железы в мире 2020

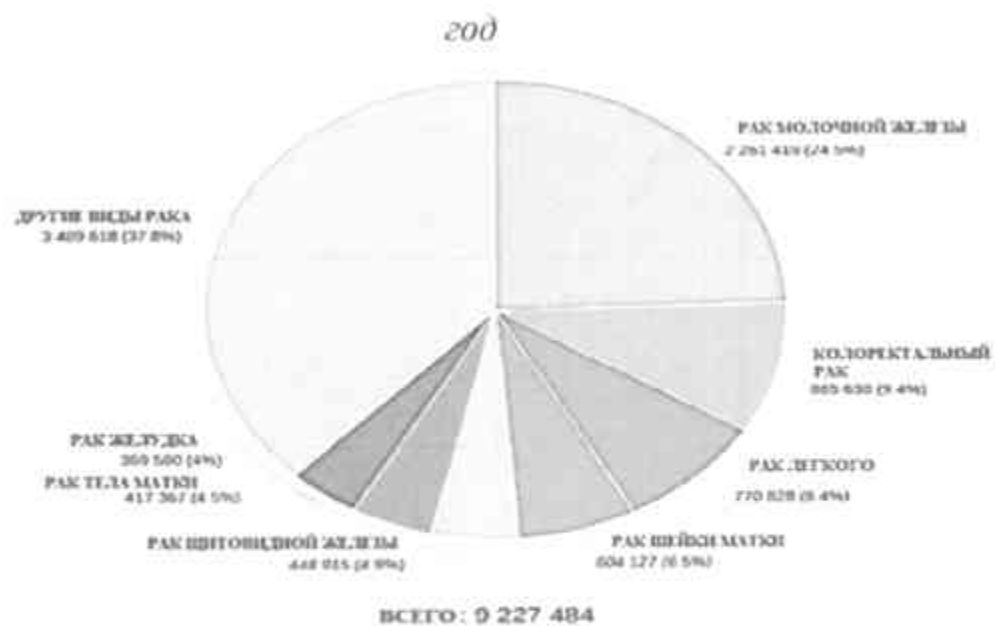


Рисунок 3. Диаграмма заболеваемости раком молочной железы в мире 2020



Рисунок 4. Карта смертности от рака молочной железы в мире 2020  
год

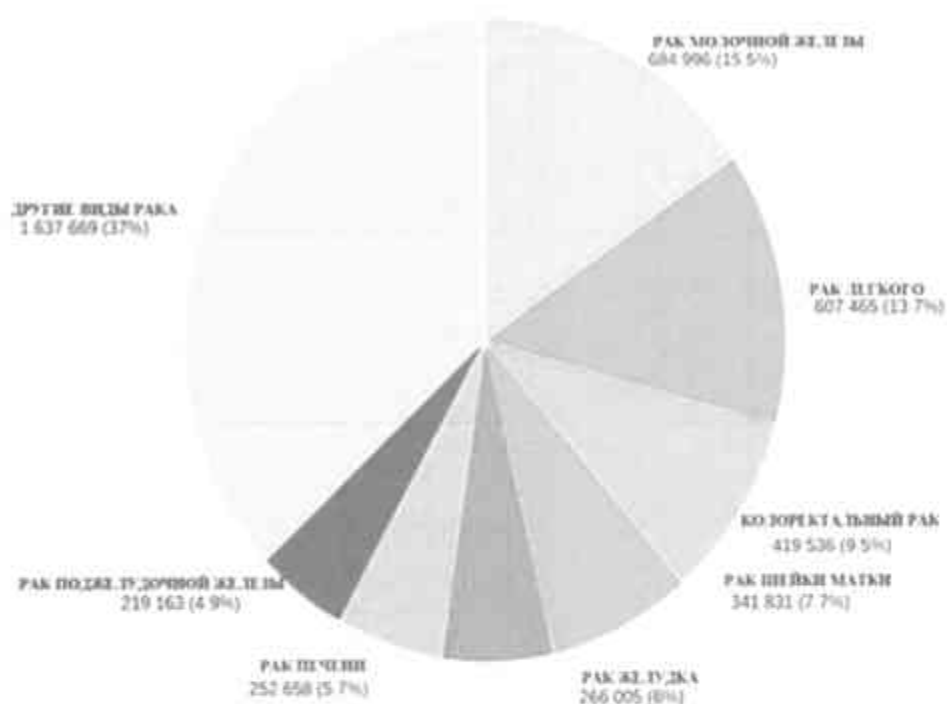


Рисунок 5. Диаграмма смертности от рака молочной железы в мире 2020  
год

Факторы риска развития рака молочной железы различны. Они могут быть генетическими и негенетическими, которые включают в себя возраст, этническую принадлежность, раннее менархе и поздняя менопауза, характеристики груди (анамнез), использование гормонов, употребление алкоголя, и табака, диету и др [55]. Мутации в генах-супрессорах опухолей BRCA1 и BRCA2 в значительной степени связаны с развитием рака молочной железы.

Выживаемость при раке молочной железы зависит как от стадии, так и от молекулярного подтипа [14]. Поскольку на ранних стадиях мало признаков и симптомов, раннее выявление является важной стратегией для улучшения исходов выживаемости.

- **Негенетические факторы риска**

- 1)Возраст. Заболеваемость раком молочной железы и смертность увеличиваются пропорционально с возрастом. Во всем мире пик этого заболевания приходится на возраст 60 лет с резким подъемом, начинающимся в возрасте 40 лет.

- 2) Этническая принадлежность

Существуют значительные различия в долгосрочной выживаемости рака молочной железы между чернокожими и белыми женщинами в Соединенных Штатах. Уровень смертности от рака для каждой известной стадии на момент постановки диагноза. У чернокожих женщин было меньше шансов выжить после рака молочной железы [2, 23], чем у белых женщин, несмотря на единообразное лечение, даже с поправкой на стадию заболевания, характеристики опухоли, последующее наблюдение и другие факторы риска рака молочной железы .

В афроамериканских странах уровень жизни значительно ниже, чем в других странах [10]. В дополнение к очевидным социально-экономическим различиям у афроамериканских женщин риск развития генетически агрессивный тип рака наиболее высок.

- 3) Раннее менархе и поздняя менопауза

У женщин с ранней менструацией примерно на 20% чаще диагностируют рак молочной железы, по сравнению с теми, у которых менструация начинается в возрасте 13 лет. Кроме того, женщины, менопауза которых начинается в возрасте 55 лет и старше примерно на 12% имеют более высокий риск развития РМЖ по сравнению с теми, у которых менопауза начинается в возрасте от 50 до 54 лет [36]. Помимо этого на развитии рака молочной железы может влиять увеличение репродуктивного возраста.

#### 4) Характеристика груди

Женщины с раком молочной железы в анамнезе подвержены более высокому риску повторного развития заболевания, особенно если первоначальный возраст при постановке диагноза был менее 40 лет. Выше вероятность развития нового инвазивного рака молочной железы по сравнению с женщинами без предыдущего диагноза. Другими значительными ассоциациями с повышенным риском являются пролиферативные поражения с атипией (т. е. атипичная гиперплазия протоков и атипичная дольковая гиперплазия), которые связаны с риском развития рака молочной железы в 4-5 раз выше среднего, и пролиферативные поражения без атипии (т. е. гиперплазия протоков и фиброаденома) [13, 20]. Плотная ткань молочной железы увеличивает риск рака молочной железы. Усложняет эту проблему тот факт, что более плотное строение груди ухудшает маммографическое обнаружение рака молочной железы, что ведет к более поздней диагностике и постановке диагноза [47].

Также к негенетическим факторам риска следует отнести низкий уровень качества жизни (доход, образование), употребление гормонов в период менопаузы, нездоровый образ жизни (употребление табака, алкоголя).

#### • Генетические факторы риска

Почти у трети больных РМЖ герминальные мутации генов BRCA1 и BRCA2 не представлены в спектре наследственных форм, так как выявлены другие гены, изменения в которых приводят к образованию опухолей. У

некоторых больных РМЖ начало заболевания связано с мутациями в генах CHEK2, NBS1, TP53 [48]. У остальных пациенток РМЖ имеет спорадический характер.

Рак молочной железы, связанный с мутациями генов BRCA1 и BRCA2, имеет более высокий индекс Ki67 [54]. Развитие инвазивного неспецифического процесса РМЖ в большинстве случаев обусловлено герминальными мутациями в гене BRCA1.

Факторы риска потенциально опасных мутаций BRCA включают рак молочной железы, диагностированный в возрасте до 50 лет, двустороннее злокачественное новообразование молочной железы, наличие рака молочной железы и рака яичников, наличие рака молочной железы по крайней мере у одного члена семьи, являющегося родственником мужского пола, множественные случаи рака молочной железы [50]. Женщинам, у которых хотя бы у одного члена семьи диагностирован и лечится связанный с BRCA рак молочной железы или яичников, следует рассмотреть вопрос о проведении генетического тестирования. Доступно несколько инструментов для оценки риска наличия мутации BRCA, и это определяет, следует ли направлять пациента для рассмотрения вопроса о тестировании [11].

В норме ген-супрессор BRCA1/2 подавляет опухолевый рост и поддерживает стабильность генетического аппарата клеток.

BRCA1 картирован на длинном плече 17 хромосомы (17q21) и состоит из 22 кодирующих и 2 некодирующих экзонов, разделенных интронами. Он отвечает за наследственную предрасположенность к РМЖ [12, 21].

Для генов BRCA1/2 характерны известные варианты генных мутаций: инсерции (ins), делеции (del), трансверсии, транзиции, полиморфизмы и некоторые другие (Таблица 1).

Таблица 1 – Варианты мутаций гена BRCA1/2

| ГЕН   | ЭКЗОН | ТИП МУТАЦИИ | ОБОЗНАЧЕНИЕ | ЭФФЕКТ                 |
|-------|-------|-------------|-------------|------------------------|
| BRCA1 | 20    | Инсерция    | 538insC     | Сдвиг рамки считывания |
| BRCA1 | 2     | Делеция     | 18delAG     | Сдвиг рамки считывания |
| BRCA1 | 11    | Делеция     | 415delA     | Сдвиг рамки считывания |
| BRCA1 | 11    | Делеция     | 2080delA    | Сдвиг рамки считывания |
| BRCA1 | 5     | Трансверсия | C61G        | Мисенс-мутация         |
| BRCA2 | 11    | Делеция     | 6174delT    | Сдвиг рамки считывания |

Мутации в гене BRCA1/2 могут приводить к потере функциональных возможностей белков и ошибкам репликации. При этом повышается чувствительность к генотоксическим воздействиям [59]. Причиной развития неоплазий женских репродуктивных органов за счет запуска системных патологических процессов также могут быть генетические поломки в гене BRCA1/2.

Генетическое тестирование BRCA следует пациенткам, у которых есть семейная история [26] конкретных известных мутаций или представителей определенных этнических групп, могут быть проверены на наличие этих конкретных мутаций или мутаций, о которых известно, что они присутствуют в определенных этнических группах. Если нет конкретной истории или этнического происхождения, рекомендуется более полное генетическое тестирование BRCA [57]. Результаты генетического тестирования сообщаются как положительные, варианты неопределенного клинического значения, неинформативные отрицательные или истинно отрицательные.

## 1.2 Морфологические формы РМЖ

Таблица 2 – Гистологические формы инвазивной карциномы молочной железы

| ФОРМЫ                                                                      | КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА                                                                                                                                                                                                                 |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Протоковая карцинома in situ                                               | Клональная пролиферация опухолевых клеток из терминальной части протоково-долькой единицы. Базальная мембрана и слой миоэпителия сохранен. Возможно распространение опухолевых клеток по протокам в пределах сегмента молочной железы. |
| Дольковая карцинома in situ                                                | Клональная пролиферация опухолевых клеток из терминальной части протоково-долькой единицы с нарушенным межклеточным сцеплением, что связано с нарушенной экспрессией E-кадгерина (мутации гена CDH1).                                  |
| Инвазивная (инфильтративная) карцинома неспецифицированного типа (IBC-NST) | Большинство инвазивных карцином представляют собой протоковые карциномы, не классифицируемые как специфические подтипы.                                                                                                                |

Выделяют особые гистологические формы инвазивной карциномы молочной железы [43]. Это связано не только с особенностями морфологии, но и наличием специфических генетических aberrаций, прогноза и чувствительности к терапии (Таблица 3).

*Таблица 3 – Особые гистологические формы инвазивной карциномы молочной железы*

| <b>ФОРМЫ</b>                      | <b>КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА</b>                                                                                                                                                                                  |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| дольковая карцинома               | ассоциированная с мутациями гена CDH1, кодирующего E-кадгерин. Высокий риск метастазирования, особенно по брюшине, забрюшинной клетчатке, оболочках мозга, в органы желудочно-кишечного тракта, яичник, матку. |
| карцинома с медуллярным паттерном | ассоциированная с подавлением активности гена BRCA1                                                                                                                                                            |
| муцинозная (коллоидная) карцинома | Наличие внеклеточного муцина                                                                                                                                                                                   |
| тубулярная карцинома              | Вариант инвазивной протоковой карциномы, который характеризуется упорядоченным трубчатым строением                                                                                                             |
| крибриформная карцинома           | Тип инвазивного рака молочной железы с частотой приблизительно 0,3-6% первичных карцином молочной железы, имеющих решетчатый рисунок                                                                           |
| папиллярная карцинома             | Папилломы (папиллярные разрастания) в простветах протоков и долек молочной железы                                                                                                                              |
| апокриновая карцинома             | Апокринный эпителий имеет характерный профиль стероидных рецепторов, который является отрицательным по рецепторам эстрогена и прогестерона и положительным рецептору андрогена                                 |

Таблица 3. Продолжение

|                             |                                                                                                                                                                                        |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| микропапиллярная карцинома  | Представляет собой агрессивную форму с выраженной склонностью к лимфососудистой инвазии и метастазированию в лимфатические сосуды                                                      |
| метапластическая карцинома  | Особенностью этого вида опухоли является высокая степень агрессивности                                                                                                                 |
| секреторная карцинома       | Инвазивный рак, состоящий из эпителиальных клеток с внутриклеточными секреторными вакуолями и внеклеточных эозинофильных пузырьков с секретом, имеющих различное строение              |
| мукоэпидермоидная карцинома | Первичная опухоль молочной железы, идентичная по строению с аналогичной опухолью слюнных желез, в которой одновременно могут выявляться базалоидные, эпидермоидные и муцинозные клетки |

### 1.3 Молекулярно-генетическая классификация РМЖ

Классификация РМЖ на основе экспрессии ИГХ-маркеров была впервые сформулирована в 1982 г. R. Moll и соавторами. Предложено разделять опухоли на люминальные и базальные в зависимости от того, какие цитокератины в них экспрессируются [16].

Четыре основных подтипа рака РМЖ были идентифицированы в соответствии с изменениями в экспрессионном профиле рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR), HER2NEU (онкобелок) и индексом пролиферации клеток KI67 (Таблица 4). Эти молекулярные подтипы включают люминальный А и В, базальноподобный и HER2NEU-сверхэкспрессирующий подтип [8, 27].

РМЖ гетерогенен на молекулярном уровне и имеет различные паттерны экспрессии генов, приводящие к различиям в поведении опухолей

и прогнозе заболевания. Типы РМЖ с отрицательным статусом *ER*, *PR* и *HER2NEU* обычно называют «**тройным отрицательным**» раком молочной железы (**трипл-негативным**) и приблизительно соответствуют базальной категории [29].

*Таблица 4 – Молекулярные подтипы рака молочной железы и ключевые изменения в генотипе опухоли*

| Молекулярный подтип | Экспрессия рецепторов | Изменения в генотипе                                                                 |
|---------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Люминальный А       | ER+ и/или PR+, HER-2- | Мутация в генах PIK3CA, MAP3K1, GATA3, FOXA1, выраженная экспрессия генов ESR1, XBP1 |
| Люминальный В       | ER+ и/или PR+, HER-2+ | Мутация в генах TP53, PIK3CA, амплификации циклина D1, MDM2, потеря гена ATM         |
| Her-2+              | ER-, PR-, HER-2+      | Мутация в генах TP53, PIK3CA, APOBEC, амплификации HER2, циклина D1                  |
| Базальноклеточный   | ER-, PR-, HER-2+/-    | Мутация в генах TP53, потеря генов RB1, BRCA1, активация FOXM1                       |

Таблица 5 – Молекулярные подтипы рака молочной железы и их краткая характеристика

| Молекулярные подтипы рака молочной железы | Краткая характеристика                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Люминальный (Luminal) A                   | является наиболее распространенным подтипом рака молочной железы и характеризуется ER и/или PR – положительными рецепторами /HER2NEU отрицательным статусом, низкой экспрессией генов пролиферации, менее агрессивной опухолью и хорошим прогнозом.                         |
| Тип люминальный (Luminal) B               | отличается от Люминального A подтипа ER и/или PR положительными рецепторами HER2 отрицательным статусом или HER2 положительным статусом и имеет большую экспрессию генов пролиферации. Эта опухоль прогностически менее благоприятна по сравнению с люминальным A подтипом. |
| Люминальный B<br>HER2NEU положительный    | характеризуется гиперэкспрессией или амплификацией HER2NEU. До появления анти HER2 препаратов прогноз у больных с HER2 обогащенным подтипом РМЖ был наихудшим, но сейчас ситуация изменилась в связи с возможностью успешной таргетной терапией.                            |

Таблица 5. Продолжение

|                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Базальноподобный подтип | <p>распространен в предклимактерическом, молодом возрасте и при избыточном весе пациентов.</p> <p>Опухоли базальноподобного подтипа, составляющие 15—20% всех случаев РМЖ, характеризуются низкой экспрессией генов люминального кластера и генов HER2. Соответственно, эти опухоли РЭ, РП и HER2 негативные.</p> <p>Базальноподобные опухоли характеризуются высокой экспрессией генов пролиферативного кластера, геномной нестабильностью и высокой экспрессией гена эпидермального фактора роста (EGF), а также наличием уникального кластера базальных генов, включая гены базальных цитокератинов 5/6, 14 и 17. До 10% больных с базальноподобным РМЖ имеют мутации гена BRCA1, и 80% больных с мутацией гена BRCA1 имеют базальноподобный подтип РМЖ.</p> <p>Этот подтип также ассоциируется с высокоагрессивными опухолями, в следствие чего имеет неблагоприятный прогноз. Очень часто именно этот рак является наследственным.</p> |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Таблица 5. Продолжение

|                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Подтип HER2NEU<br>экспрессирующий ( <i>HER2NEU</i><br>позитивный, ER и PR отрицательный) | характеризуется агрессивными<br>опухолями и плохой выживаемостью.<br>Но опухоли с гиперэкспрессией и<br>амплификацией онкобелка HER2NEU<br>чувствительны к гертикаду<br>(герцептину, трастузумабу) одному<br>из самых эффективных таргентных<br>препаратов, который применяют для<br>лечения РМЖ. |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Совпадение иммуногистохимической и молекулярной классификации далеко не полное.

Для выявления групп пациентов, у которых наблюдается самый лучший ответ на лечение и наименьшие побочные эффекты о него, маркеры занимают значимое место [4, 33]. При РМЖ эстрогеновый рецептор и HER-2-рецептор в настоящий момент являются самыми значимыми маркерами. Они служат мишенями для таргетной терапии и имеют прогностические данные.

Экспрессионные подтипы содержат различные классы мутаций. Наиболее часто мутации находят в генах PIK3CA и TP53 – в более чем 1 / 3 образцов РМЖ. PIK3CA обладает онкогенной активностью, а TP53 – онкосупрессор опухоли. В гене PIK3CA наблюдается высокая частота мутаций. Поэтому для таргетной терапии РМЖ этот ген может быть перспективной мишенью [34].

Герминальные мутации генов TP53 и BRCA1/2 могут спровоцировать возникновение наследственного РМЖ и рака яичников. Известно, что более, чем в половине случаев злокачественных новообразований мутирует Ген-супрессор опухоли TP53, а гены BRCA1 и BRCA2 экспрессируются в нормальных клетках и участвуют в поддержании стабильности генома.

EAVB2 – официальное сокращение, предложенное Комитетом генетической номенклатуры HUGO для гена гомолога эритробластного лейкоза птиц v-erb-b2, кодирующего тирозинкиназный рецептор семейства

эпидермальные факторы роста [40]. Наиболее часто употребляется название HER2. Белок Her2 принадлежит к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), состоящему из 4 трансмембранных тирозинкиназных рецепторов: HER1 (EGFR/ErbB1), HER2 (ErB2/neu), HER3 (ErB3) и HER4 (ErbB4) [58].

Путь ErbB является одной из наиболее широко изученных систем передачи сигналов, вовлеченных в функционирование нормальных клеток, и при некоторых типах рака. Нарушение регуляции активности рецепторов семейства ErbB и нисходящих сигнальных путей связано с развитием некоторых опухолей у человека [27].

В опухолевой клетке всегда присутствуют немутантные молекулы EGFR. За счет мутаций, гиперэкспрессии рецепторов, гиперактивности лигандов и кофакторов во многих эпителиальных опухолях активированы сигнальные пути, опосредованные семейством EGFR. Эти сигнальные пути важны в регуляции многих метаболических и физиологических процессов [53].

Конформационные изменения рецептора, вызывают его димеризацию с другими членами семейства EGFR (гомо- или гетеро-). Такие изменения вызывает лиганд, который связывается с экстрацеллюлярным доменом. Вследствие чего активируются тирозинкиназный домен и аутофосфорилирование [3]. Далее различные внутриклеточные сигнальные пути, передающие активирующий сигнал в ядро клетки, такие как PI3K/Akt или Ras/Raf/MAPK и STAT каждый димер может запускать результате аутофосфорилирования. Эти сигнальные пути играют очень важную роль в канцерогенезе.

Ген рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2-го типа ERBB2 (HER2) локализован на хромосоме 17 и амплифицируется приблизительно в 15—20 % опухолей у пациентов с первичным РМЖ. В опухолях с гиперэкспрессией данного гликопротеида ведущим механизмом, ответственным за увеличения количества белка, является амплификация его

гена [49]. Амплификация гена четко коррелирует с экспрессией белка. Доказана взаимосвязь между HER2-статусом опухоли и клиническими исходами. HER2-позитивный подтип хорошо поддается таргетной терапии с использованием различных блокаторов HER2.

Было отмечено, что с высоким риском рецидива рака молочной железы была связана гиперэкспрессия ERBB2.

#### **1.4 Лекарственная терапия при РМЖ.**

Одним из методов лечения рака молочной железы является лекарственная терапия.

Современные лекарственные препараты должны быть направлены на увеличение продолжительности и качества жизни больной.

Так, современные лекарственные агенты отличаются либо таргетным воздействием на опухолевый процесс, либо имеют особую лекарственную форму [30].

Общими противопоказаниями являются случаи тяжелых соматических заболеваний в стадии декомпенсации, когда риск возможных осложнений для жизни в процессе лечения выше риска прогрессирования РМЖ.

На выбор лекарственной терапии влияют биологические маркёры (ER, PR, HER2, Ki67).

Для больных с люминальным А подтипом основным методом системной терапии является гормонотерапия, а химиотерапия используется по показаниям; для больных с люминальным В подтипом — гормонотерапия и химиотерапия, причем у больных с люминальным В подтипом и гиперэкспрессией HER2 гормонотерапия и цитотоксическая химиотерапия дополняются анти HER2 препаратами; при рецептор негативном HER2 обогащенном РМЖ показана анти HER2 терапия в сочетании с цитотоксическими препаратами; у больных с тройным негативным РМЖ используется цитотоксическая химиотерапия. В

таблице 5 указаны препараты, направленно действующие на рецепторы семейства c-erbB [14, 28].

Адьювантная или дополнительная терапия проводится после выполнения радикальных операций в случае операбельного или раннего рака молочной железы.

Основные прогностические факторы, определяющие критерии выбора адьювантной терапии при раке молочной железы – это определение гормонозависимости опухоли (ее рецепторный статус или уровень экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона) [45].

Важнейшим прогностическим признаком является гиперэкспрессия или амплификация рецептора эпидермального фактора роста Her-2-neu.

*Таблица 6 – Препараты, направленно действующие на рецепторы семейства c-erbB*

| <b>Препарат</b>          | <b>Рецептор-мишень</b> | <b>Механизм действия</b>                                      | <b>Год</b> |
|--------------------------|------------------------|---------------------------------------------------------------|------------|
| Иресса<br>(шефитиниб)    | HER1 - РЭФР            | Специфический<br>низкомолекулярный ингибитор<br>тирозинкиназы | 2003       |
| Эрбикус<br>(цетуксиниб)  | HER1 - РЭФР            | мАТ к внеклеточному домену                                    | 2004       |
| Тарцева<br>(эрлотиниб)   | HER1 - РЭФР            | Специфический<br>низкомолекулярный ингибитор<br>тирозинкиназы | 2005       |
| Омнитарг<br>(пертазумаб) | HER2                   | мАТ – ингибитор димеризации<br>(HDI)                          | 2005       |
| Тайвеб<br>(лапатиниб)    | HER1 - HER2            | Двойной ТК ингибитор                                          | 2006       |

Таблица 6. Продолжение

|                            |             |                                              |           |
|----------------------------|-------------|----------------------------------------------|-----------|
| Вектибис<br>(панитамумаб)  | HER1 - РЭФР | мАТ- к лиганд-связывающему<br>домену         | 2006-2008 |
| Герцептин<br>(трастузумаб) | HER2        | мАТ к проксимальному<br>внеклеточному домену | 1998      |

Неoadьювантная терапия РМЖ – это системное лечение, которое проводится до начала локального лечения (хирургического вмешательства или лучевой терапии), задачами которой является уменьшение размеров первичной опухоли и регионарных метастазов [11], уменьшение объема оперативного вмешательства, определение чувствительности опухоли к цитостатикам, выявление резистентных случаев с целью использования альтернативных режимов для адьювантной химиотерапии, увеличение общей и безрецидивной выживаемости, оценка новых режимов лечения по частоте полной клинической и морфологической ремиссии [35].

На данный момент для химиотерапии метастатического рака молочной железы большим успехом пользуются следующие препараты: антрациклины, препараты таксанового ряда, препараты платины, капецитабин, блеомицин.

Такие препараты, как золадекс, тамоксифен, фарестон (торимиufen) применяют для лечения метастатического рака у женщин в пременопаузе. Для лечения РМЖ у постменопаузальных больных эффективным является препараты – ингибиторы ароматазы (фемара, аримидекс, экзаместан) [41,44].

Самым перспективным направлением в лечении метастатического рака является таргентная терапия. К этой группе препаратов относятся соединения молекулярно-направленного характера [51, 56]. У таких препаратов направленное действие, то есть должна быть конкретная мишень. Они воздействуют на молекулярные структуры. Это могут быть наружные и внутриклеточные рецепторы, белки, которые участвуют в образовании опухоли, а также кровеносные сосуды, которые образуются вокруг.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1 Материалы исследований

Объектом исследования являются женщины, больные раком молочной железы, проходившие обследование в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения города Москвы Городская клиническая онкологическая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы (ГБУЗ «ГКОБ №1 ДЗМ») в период 13.01.2021 по 29.04.2022 .

В исследование включались пациентки средний возраст которых составил 35-65 лет. При обследовании у пациенток моложе 50 лет или имеющих морфологический диагноз трижды негативный рак молочной железы была взята кровь на BRCA1/2. За весь период было проведено 5206 исследований белка Her2 у пациенток на биопсийном и операционным материале. Из них в 175 случаях понадобилось проведение уточняющего метода исследования статуса гена *Her2/neu*. На BRCA1/2 были обследованы 347 пациенток. И пациентки с Люминальным типом рака исследовались на PIK3/CA.

### 2.2 Методы исследований

#### 2.2.2. Морфологический метод

Гистологическое исследование проводилось по стандартной методике. Ткань молочной железы вырезали острым ножом или бритвой, стараясь при этом ее не сдавливать. Кусочки были толщиной 0,5–1,0 см с таким расчетом, чтобы получаемый срез поместился на стандартное предметное стекло. Сразу после забора образец ткани помещают в емкость с фиксатором (10 % формалин). Соотношение объема исследуемого материала к объему формалина составляет 1:20. Емкость плотно закрывали. В случае присутствия в материале примеси крови образец помещали в марлевый мешочек и промывали в физиологическом растворе, после чего, предварительно удалив излишки промывной жидкости, переносили в фиксатор. «Продолжительность фиксации составляла от нескольких часов до

1 суток. После фиксации материал промывали с тем, чтобы избавить его от избытка фиксатора и различных осадков фиксирующей жидкости. Обезвоживание ткани производили постепенно для избежания сморщивания путем проведения ее через спирты возрастающей крепости: 50°, 60, 70, 80, 90, 96°. При заливке в парафин кусочки из спирта переносили в ксилол и за тем в расплавленный насыщенный раствор парафина, где они находились в термостате при температуре 37° до 1 суток и более. Дальнейшая заливка проводилась в термостате при температуре 54–56° в трех порциях парафина. Срезы с блоков изготавливаются на микротоме. В специальных устройствах микротом зажимался парафиновый блок и микротомный нож» [38].

Далее производилась серия срезов. Изготовленные на микротоме срезы окрашивались. Перед окраской из парафиновых срезов обязательно удаляют парафин путем проведения в ксилоле. Для окрашивания гистологических срезов применялся раствор гематоксилина и 1–2 % эозина [38].

Протокол окраски препаратов гематоксилин-эозином:

1. Парафиновые срезы депарафинизируют в растворе ксилола 5 мин. в двух сменах, затем отмывают в двух спиртах 96° и промывают в дистиллированной воде.
2. Окраска гематоксилином – в течение 3–5 мин.
3. Промывка в воде – 2 мин.
4. Дифференцировка в спирте, подкисленном соляной кислотой (1 %-й раствор соляной кислоты в 70 %-м спирте), несколько секунд с последующим восстановлением подщелоченной водой (около 1 мин.).
5. Промывка в проточной воде.
6. Ополаскивание дистиллированной водой.
7. Окраска 1 %-м эозином – 1–2 мин.
8. Ополаскивание дистиллированной водой.
9. Обезвоживание в спирте – 2 мин.
10. Просветление в ксилоле – 2 мин.
11. Заключение среза – капля бальзама, покровное стекло [38].

На основании полученных срезов врачом-патологом выставлялся диагноз. При необходимости выполнялось иммуногистохимическое исследование (ИГХ) для уточнения диагноза.

На основании полученных срезов врачом-патологом выставлялся диагноз. При необходимости выполнялось иммуногистохимическое исследование (ИГХ) для уточнения диагноза [38].

### **2.2.3. Иммуногистохимический метод**

Первым этапом ИГХ исследования было изготовление срезов на ротаторном микротоме толщиной 2–3 мк. Для приготовления иммуногистохимических препаратов использовались покрытые поли-L-лизинном стекла. После фиксации в формалине и заливки в парафин тканевые антигены необходимо было демаскировать. Эта процедура направлена на восстановление оригинальной структуры белка.

Демаскирование клеточных антигенов осуществляли путем нагревания в приборе PT Module с использованием буфера Trilogy™ (Cell Marque, артикул 920P-09, 1000 мл). С начала нагревали PT Module до температуры 65°, поставили в него стекла, далее нагревали до 95°, и поддерживали температуру 20 мин., далее охлаждали до температуры 65°. После охлаждения стекол их помещали в Трис-буфер (промывочный буфер с Твин-20) (TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (Cell Marque, артикул 935B-09, 1000 (x20) мл) и приступали к следующему этапу – блокировке эндогенной активности. Стекла обводили гидрофобным маркером и раскладывали в камеры с фильтровальной бумагой, смоченной дистиллированной водой. В течение всей иммуногистохимической реакции необходимо было поддерживать влажную среду для срезов и ни в коем случае не допустить их пересыхания, чтобы не нарушать качество данного исследования. Для нейтрализации эндогенной пероксидазной активности на срезы на 10 мин. наносили 1–3 %-й раствор перекиси водорода. После проведения данного этапа смывали раствор перекиси водорода в нескольких порциях Трис-буфер

(промывочный буфер с Твин-20)( TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (Cell Marque, артикул 935B-09, 1000 (x20) мл) и оставляли в последней порции на 3–4 мин., далее приступали к следующему этапу. Перед нанесением первичных антител со срезов, находящихся в Трис-буфере (промывочный буфер с Твин-20), удаляли избыток буфера и наносили на срез небольшое количество первичного антитела, от 30 до 50 мкл. Затем срезы помещали горизонтально во влажную герметичную камеру для предотвращения неспецифического связывания антител с тканью за счет их высыхания. И проводили инкубацию в термостате при температуре 37° в течение 30–60 минут. После проведения данного этапа смывали первичные антитела в нескольких порциях Трис-буфера (промывочный буфер с Твин-20)( TBS IHC Wash Buffer + Tween® 20 (Cell Marque, артикул 935B-09, 1000 (x20) мл) и оставляли в последней порции на 3–4 мин., после чего приступали к следующему этапу. В качестве демаскировочной системы использовали систему детекции Дако REAL ЭнВижн, Пероксидаза/ДАБ, Кроличьи/Мышиные (Dako REAL EnVision Detection System, Peroxidase/DAB+, Rb/Mo, DAKO, артикул K500711, 500 тестов) в ручном режиме по стандартной методике. Далее срезы промывали в дистиллированной воде. Докрашивают ядра гематоксилином Майера (Бiovитрум, артикул 05-002/M, 500мл) 1–2 мин. Промывали срезы в проточной воде. Проводили дегидратацию в батарее спиртов 3–4 спирта 96° и в 3–4 порциях ксилола, далее заключали под покровное стекло.

Часть реакций ИГХ проводили с использованием Иммуногистостейнера Ventana Bench Mark ULTRA. Для визуализации использовали систему ultraVIEW Universal DAB Detection Kit (Система визуализации ultraVIEW Universal DAB, артикул 760-500, набор на 250 тестов) по стандартному протоколу.

Каждое предметное стекло кладется на независимую нагревательную пластину и снабжено индивидуальной системой загрузки/выгрузки. Таким образом, любое стекло может быть окрашено в срочном режиме с помощью

любой методики (ИГХ, CISH, SISH) без остановки, перенастройки, ожидания окончания других реакций в приборе [60].

Антитела расфасованы в специальные пластиковые диспенсеры. Нанесение реактивов на препарат происходит непосредственно из дозирующего носика диспенсера. Это полностью устраняет контаминацию между реактивами и сокращает время работы.

На стекло всегда дозируется автоматически ровно 100 мкл реактива вне зависимости от размера среза на стекле и его положения на нем, что позволяет экономить время на настройку дозировки и собственно реактив.

Каждый диспенсер снабжен штрих-кодом, который автоматически считывается прибором и несет всю необходимую информацию о наименовании реактива, сроке годности, количестве израсходованных и доступных тестов. Объемные канистры обеспечивают непрерывную работу прибора [38].

В данном исследовании использовалась дифференциально-диагностическая панель маркеров-антител: Her2.

При диагностике статуса белка HER2 обычно оценивают с помощью комбинации иммуногистохимии (ИHC, для оценки уровней экспрессии белка HER2) и гибридизации *in situ* (ISH, для оценки статуса гена HER2). Иммуногистохимические методы выявляют антигены в срезах тканей с помощью иммунологических и химических реакций. Этот метод является высокочувствительным и специфичным и может обнаруживать широкий спектр антигенов. Алгоритм иммуногистохимического тестирования HER2-статуса и критерии оценки гиперэкспрессии HER2/neu при раке молочной железы представлены на рисунках 6 и 7 соответственно.



Рис. 6 Алгоритм иммуногистохимического тестирования HER2-статуса

| ИГХ-реакция                                                                            | Картина реакции                                                                                                                                           | Оценка экспрессии HER2 |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
|  0  | Отсутствие мембранного окрашивания или наличие менее 10% опухолевых клеток                                                                                | Негативная             |
|  1+ | Слабое и неполное мембранное окрашивание 10% опухолевых клеток, или слабое равномерное мембранное окрашивание менее 10% опухолевых клеток                 | Негативная             |
|  2+ | Слабое равномерное или яркое мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток, или яркое равномерное мембранное окрашивание менее 10% опухолевых клеток | Неопределенная*        |
|  3+ | Яркое равномерное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток                                                                                      | Позитивная             |

\*Повторное тестирование с помощью гибридизации in situ

Рисунок 7. Критерии оценки гиперэкспрессии Her2/neu при раке молочной железы

#### 2.2.4. Молекулярно-генетический метод

В данном исследовании были использованы несколько молекулярно-генетических методов для выявления мутаций в исследуемых образцах.

При сомнительном статусе белка Her2 материал направлялся на уточняющее исследование – FISH. Методика использовалась согласно инструкциям производителя и представлена ниже. Для приготовления FISH-препаратов использовались высоко адгезивные стекла. Толщина изготавливаемых срезов – 2–3 мкм. Первым этапом стекла со срезами, прочно зафиксированный на высокоадгезивном предметном стекле проходят этап депарафинизации и регидратации в ходе которого стекло со срезом помещаем в емкость с ксилолом №1 на 10 мин, затем в емкость с ксилолом №2 на 10 мин. Далее переносим стекла в батарею спиртов (2 флакона 96% этилового спирта и 1 флакон 70% этилового спирта) по 2 мин. В завершение перового этапа помещаем стекла на 3 мин в промывающий буфер. Следующим этапом идет демаскировка. Для этого помещаем флакон с буфером в предварительно разогретую до 95-99°C водяную баню и опускаем туда секла со срезами на 15 минут. После этого снова промывам стекла промывочным буфером. Затем срезы обрабатываем пепсином и инкубируем их при комнатной температуре. Обработка протеазами и/или кислотой необходима для того, чтобы облегчить зонду проникновение к ядерной ДНК. Следующим этапом проводим дегидратацию срезов в батарее спиртов и полностью высушиваем стекла на воздухе. Следом идет этап денатурации и гибридизации. Для этого наносим на срез 3,5-10 мкл зонда в зависимости от размера среза в центр и накрываем покровным стеклом. Помещаем стекла и полоски контроля влажности в гибридайзер. При наличии на срезе ДНК, комплементарной зонду, происходит гибридизация одноцепочечной ДНК с внесенным зондом. Несвязавшиеся молекулы зонда ошибочно спарившуюся ДНК удаляют интенсивным промыванием препарата.

После гибридизации убираем покровное стекло и опускаем срезы в емкость с нагретым до 65°C пост-гибридизационным буфером на 15 минут.

Достаем стекла из пост-гибридизационного буфера и помещаем их в промывающий буфер на 3 мин. Для дегидратации помещаем стекла в батарею спиртов (3 флакона 70%, 85% и 96% этилового спирта) по 2 мин. Полностью высушить стекла на воздухе в вертикальном положении. На высушенный срез нанесим 10 мкл флюоресцентной заключающей среды, содержащей DAPI, на срез и накрыть покровным стеклом. Во избежание выцветания, храним стекла в темноте при температуре 2-8°C.

В соответствии с инструкцией к зондам гибридизация считалась успешной в тех случаях, когда ядра не менее чем 80 % опухолевых клеток имели непрерывные границы, уровень аутофлуоресценции позволял отчетливо различать зеленые флуоресцентные сигналы, внутри ядер выявлялись четкие сигналы красного и зеленого. Подсчитывались сигналы не менее чем в 50 ядрах опухолевых клеток в 4 зонах опухоли. При постановке FISH-реакции с использованием зонда HER2/neu в полученном результате мы оцениваем наличие или отсутствие амплификации гена HER2. Сначала проверяем качество окрашивания DAPI, затем оцениваем качество сигналов во внутреннем контроле. Находим области инвазивной опухоли, занимающие более 10% ее общей площади. Далее оцениваем сигналы в соответствии со схемой, представленной на рисунках 8 и 9.

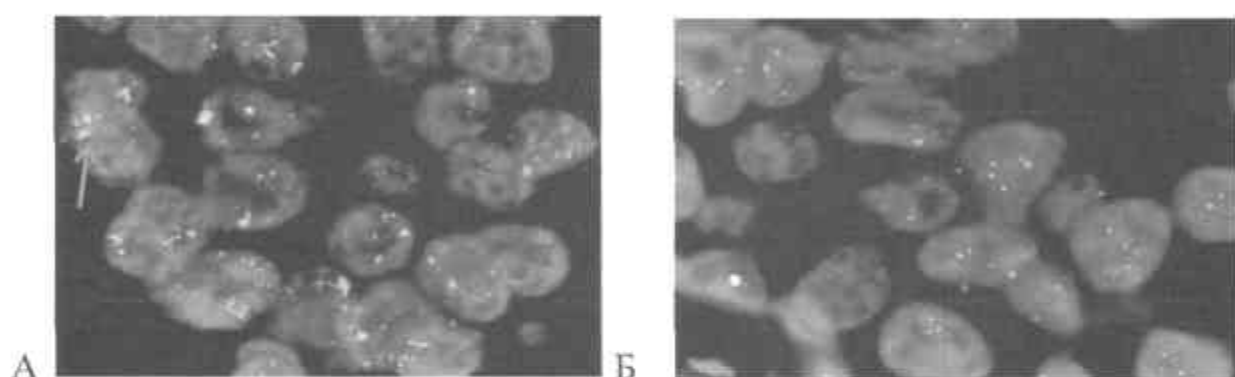


*Рисунок 8. FISH-реакции с использованием зонда HER2/neu.  
(А. Амплификация гена Her2/neu, Б. Отсутствие амплификации гена  
Her2/neu*

*(красной стрелкой обозначены сигналы копий гена HER2) )*

| Группа | HER2/CEP17 | HER2,<br>копии/клетка   | Статус<br>опухоли | Схема                                                                               |
|--------|------------|-------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 1      | $\geq 2$   | $\geq 4,0$              | Позитивный        |  |
| 2      | $\geq 2,0$ | $< 4,0$                 | Стрелдательный*   |  |
| 3      | $< 2,0$    | $\geq 6,0$              | Позитивный*       |  |
| 4      | $< 2,0$    | $\geq 4,0$<br>и $< 6,0$ | Стрелдательный*   |  |
| 5      | $< 2,0$    | $< 4,0$                 | Стрелдательный    |  |

Рисунок 9. Интерпретация результатов гибридизации *in situ* HER2/neu

Результат оценивается как соотношение числа копий гена HER2 к числу копий 17 хромосомы.

Еще одним методом используемым при диагностике рака молочной железы является метод полимеразной-цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для выявления мутаций в генах *BRCA1/2* и *PIK3CA*.

Для проведения молекулярно-генетического исследования методом ПЦР в режиме реального времени использовалась ДНК, выделенная венозной крови и/или верифицированных патоморфологом срезов, фиксированных в формалине опухолевой ткани, заключенной в парафин. ДНК выделялось согласно инструкции набора реагентов для выделения ДНК Cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24, ROCHE, Германия).

Для выделения ДНК из блоков ткани в парафине излишки парафина обрезают скальпелем и готовят серийные срезы толщиной 10 мк с площадью ткани на срезе 25–80 мм<sup>2</sup>. Первый и последний срезы серии окрашивают гематоксилином, и патоморфолог оценивает процент опухолевых клеток.

Рабочие срезы (2–4 шт) помещают в пробирку на 1,5 мл и используют для выделения ДНК» [2].

К образцу добавляли 500 мкл ксилола. Закрывали крышку и энергично перемешивали с помощью вортекса в течение 10 с. Инкубировали в течение 5 мин. при комнатной температуре. Затем добавляли 500 мкл 96 %-го этанола и инкубировали еще 5 мин. Затем центрифугировали при 13,000xg в течение 3 мин., а затем убирали над осадочную жидкость. Далее к осадку добавляли 1 мл 96 %-го этанола и перемешивали на вортексе в течение 10 с. Центрифугировали при 13,000xg в течение 3 мин. Затем удаляли надосадочную жидкость. После открывали пробирку и инкубировали при температуре 56°C в «гнезде» в течение 10 мин. до полного испарения спирта.

Далее в каждую пробирку добавляли DNA TLB 180 мкл и протеиназу К 70 мкл и тщательно перемешивали на вортексе в течение 10 с. Затем ставили инкубировать при температуре 56 °C в течение 60 мин. до полного лизиса образца. Иногда пробирки на этом этапе оставляли на ночь. Затем пробирки встряхивали и переставляли на 90 °C в течение 60 мин. По истечении времени инкубации пробирки кратковременно центрифугировали для удаления капель с крышки. Далее вносили в каждую пробирку 200 мкл DNA PVB и перемешивали пипетированием 3 раза. Оставляли для инкубации при комнатной температуре на 10 мин., а после добавляли 100 мкл изопропанола и перемешивали лизат 3 раза пипетированием. Получившийся раствор переносили в маркированную пробирку с колонкой и центрифугировали при 8,000xg в течение 1 мин. Переставляли колонку в новую пробирку и вносили по 500 мкл первого промывочного буфера (WB1). Центрифугировали при 8,000xg в течение 1 мин. Выливали содержимое пробирок в химические отходы и помещали колонку в ту же пробирку. Вносили 500 мкл второго промывочного раствора (WB2) и центрифугировали при 8,000xg в течение 1 мин. Помещали колонку в новую пробирку и центрифугировали при 13,000xg в течение 3 мин, чтобы высушить мембрану. Затем помещали колонку в промаркированную пробирку объемом 1,5 мл. Вносили 100 мкл

DNA EB на центр мембраны колонки, не касаясь самой мембраны и инкубировали в пробирке для элюции при комнатной температуре в течение 5 мин. Центрифугировали при 10,000xg в течение 1 мин., чтобы собрать весь элюат на дне пробирке, который является исходным образцом ДНК. После измеряем концентрацию ДНК в выделенном образце на приборе Qubit\* 3.0. Для этого готовим смесь буфера и красителя в необходимом количестве в зависимости от количества образцов выделенной ДНК. Для калибровки готовим два стандартных образца. В стандартные образцы добавляем 190 мкл приготовленной реакционной смеси и 10 мкл готовой смеси Стандарт№1 и Стандарт№2 соответственно. В опытные пробы вносим по 199 мкл реакционной смеси и 1 мкл выделенной ДНК. Инкубируем 5 минут и измеряем концентрацию ДНК.

Для выделения ДНК из венозной крови в 1 мл отмывочного буфера вносим 50 мкл венозной крови, перемешиваем аккуратным переворачиванием и центрифугируем 3 минуты при 7000 оборотах. Затем убираем надосадочную жидкость и добавляем 300 мкл лизирующего буфера. Перемешиваем и инкубируем при 96 С 15 минут. Готовим две стандартных пробы КО1 и КО2 согласно инструкции. Раскапываем по 30 мкл образца КО1 и КО2 в соответственно промаркированные эппендорфы. Добавляем 300 мкл лизирующего буфера и инкубируем при 96 С 15 минут. После инкубации остужаем пронумерованные смеси и стандартные пробы, добавляем в каждый эппендорф по 400 мкл раствора «Генетика» и центрифугируем 1 минуту при 10000 оборотах.

Выявление мутаций в гене *BRCA1/2* в ткани РМЖ осуществлялось методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора реагентов ВЕКТОР БЕСТ; РеалБест-Генетика BRCA по стандартной методике производителя. Выделенную ДНК раскапываем в лунки с реакционной смесью и загружаем в прибор для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). После завершения программы амплификации данные обрабатывались согласно инструкции производителя.

Выявление мутаций в гене *PIK3CA* в ткани РМЖ осуществлялось методом ПЦР в режиме реального времени на приборе Cobas Z480 с использованием набора реагентов Cobas DNA Sample Preparation Kit (cobas DNA Sample Preparation Kit, 24, ROCHE, Германия) по стандартной методике производителя. Приготавливали 3 смеси MMX-1, MMX-2, MMX-3 и MGAК в соответствии с расчетами на определенное количество образцов выделенной ДНК. Раскапываем в плашку по 25 мкл приготовленной смеси и 25 мкл выделенной ДНК. В качестве положительного контроля используем готовый ПК, отрицательный контроль – 25 ккл смеси + 25 мкл SD буфер. Плашку загружаем в прибор для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР).

После завершения программы амплификации данные обрабатывались согласно инструкции производителя (Рис. 10, 11).

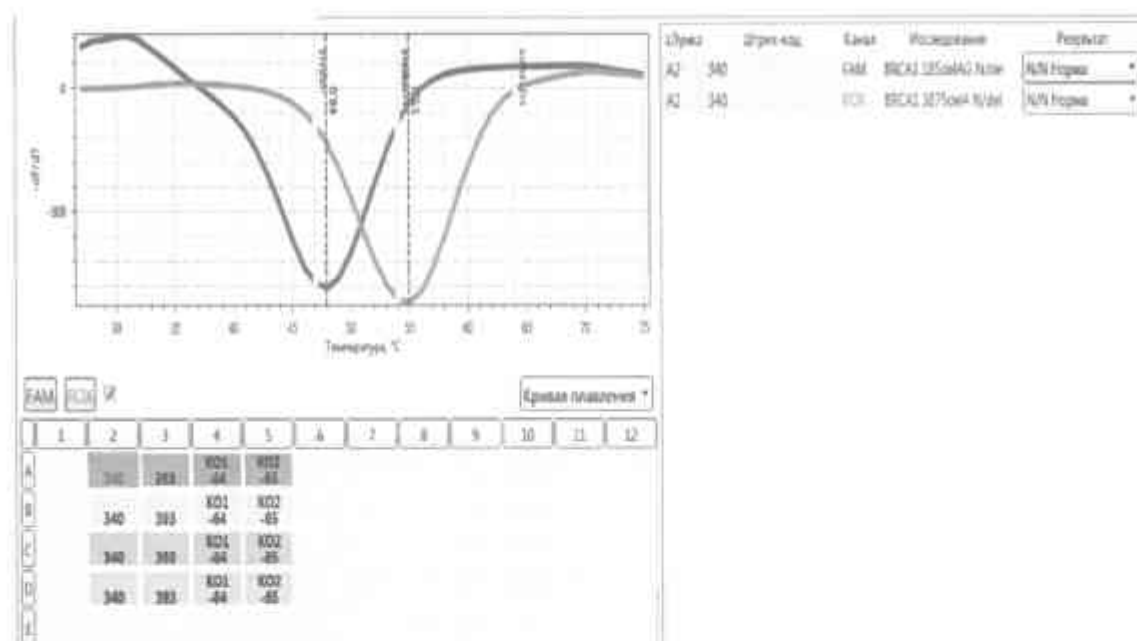


Рисунок 10. Вид полученных данных после завершения программы амплификации

| ПЦР - RealTime<br>Введите название лаборатории<br>Введите контакты лаборатории |           | ПЦР - RealTime<br>Введите название лаборатории<br>Введите контакты лаборатории |           | ПЦР - RealTime<br>Введите название лаборатории<br>Введите контакты лаборатории |           |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Штрих-код образца                                                              | 832       | Штрих-код образца                                                              | 840       | Штрих-код образца                                                              | 846       |
| Предмет исследований                                                           | Результат | Предмет исследований                                                           | Результат | Предмет исследований                                                           | Результат |
| BRCA1 185delAG<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA1 185delAG<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA1 185delAG<br>N/del                                                        | N/N Норма |
| BRCA1 2080delA(insA)<br>N/del(ins)                                             | N/N Норма | BRCA1 2080delA(insA)<br>N/del(ins)                                             | N/N Норма | BRCA1 2080delA(insA)<br>N/del(ins)                                             | N/N Норма |
| BRCA1 300 T/G                                                                  | T/T Норма | BRCA1 300 T/G                                                                  | T/T Норма | BRCA1 300 T/G                                                                  | T/T Норма |
| BRCA1 3819del5<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA1 3819del5<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA1 3819del5<br>N/del                                                        | N/N Норма |
| BRCA1 3875del4<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA1 3875del4<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA1 3875del4<br>N/del                                                        | N/N Норма |
| BRCA1 4153delA<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA1 4153delA<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA1 4153delA<br>N/del                                                        | N/N Норма |
| BRCA1 5382insC<br>N/ins                                                        | N/N Норма | BRCA1 5382insC<br>N/ins                                                        | N/N Норма | BRCA1 5382insC<br>N/ins                                                        | N/N Норма |
| BRCA2 6174delT<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA2 6174delT<br>N/del                                                        | N/N Норма | BRCA2 6174delT<br>N/del                                                        | N/N Норма |
| Врач                                                                           |           | Врач                                                                           |           | Врач                                                                           |           |
| Подпись                                                                        |           | Подпись                                                                        |           | Подпись                                                                        |           |
| 25.04.2022 15:58                                                               |           | 25.04.2022 15:58                                                               |           | 25.04.2022 15:58                                                               |           |

*Рисунок 11. Вид полученных данных после завершения программы амплификации. Интерпретация данных, полученных с прибора*

#### 2.2.5. Статистический анализ

Обработка данных осуществлялась в программном пакете Microsoft Excel методами описательной статистики: доли представлены в процентах, средние величины в виде средней со стандартным отклонением.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.3.1 Результаты анализа результатов определения белка Her2, с последующим уточнением статуса гена Her2/neu методом FISH у пациенток с неопределенным ИГХ-статусом рака молочной железы

За период с 13.01.2021 по 29.04.2022 у 2603 пациентки был диагностирован рак молочной железы. У всех у них проводилось ИГХ исследование на биопсийном материале и в последующем на операционном материале. Всего проведено 5206 иммуногистохимических исследований. Исследование проводилось как у первичных пациентов, с целью диагностики заболевания так и для определения тактики лечения пациенток.

Интерпритация результатов проводилась по рекомендациям ASCO/CAP (2018). Данные полученных результатов анализа результатов определения белка Her2, с последующим уточнением статуса гена Her2/neu методом ИГХ представлены на рисунках 12, 13, 14, 15.



*Рисунок 12. Рак молочной железы. Отрицательный HER2-статус, 0. Отсутствие мембранного окрашивания (ИГХ-исследование с антителами к HER2/neu, x200)*



*Рисунок 13. Рак молочной железы. Отрицательный HER2-статус, 1+.  
Слабое мембранное окрашивание (ИГХ-исследование с антителами к  
HER2/neu, x200)*



*Рисунок 14. Рак молочной железы. Неопределенный HER2-статус, 2+.  
Яркое неполное окрашивание более 10% клеточной опухоли (ИГХ-  
исследование с антителами к HER2/neu, x200)*

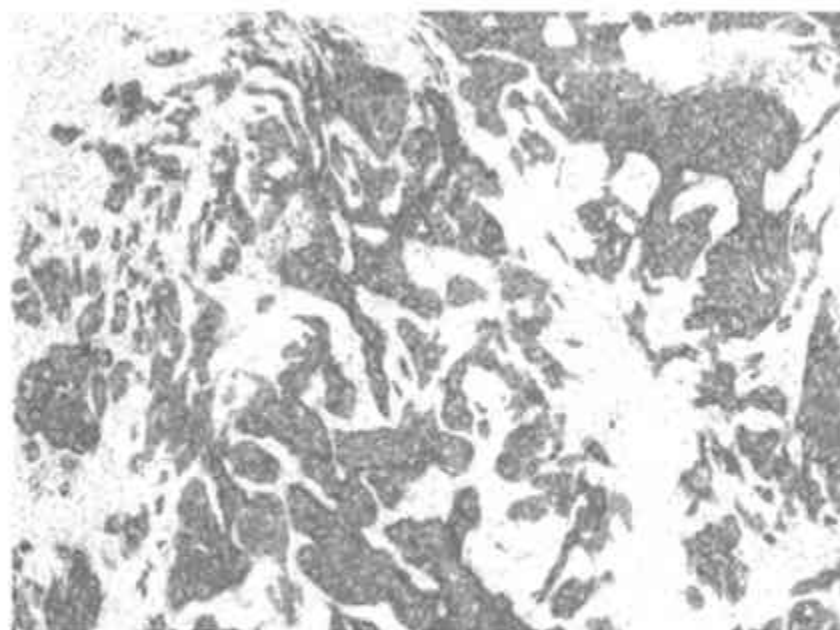


*Рисунок 15. Рак молочной железы. Положительный HER2-статус, 3+. Яркое равномерное мембранное окрашивание более 10% клеток опухоли (ИГХ-исследование с антителами к HER2/neu, x200)*

После проведения иммуногистохимического тестирования HER2-статуса, материал с неопределенным HER2-статусом (2+) направляли на FISH-исследование.

186 пациенток были направлены на FISH-исследование. Это составило 7,15% от общего числа пациенток, направленных на ИГХ (Рис. 16).

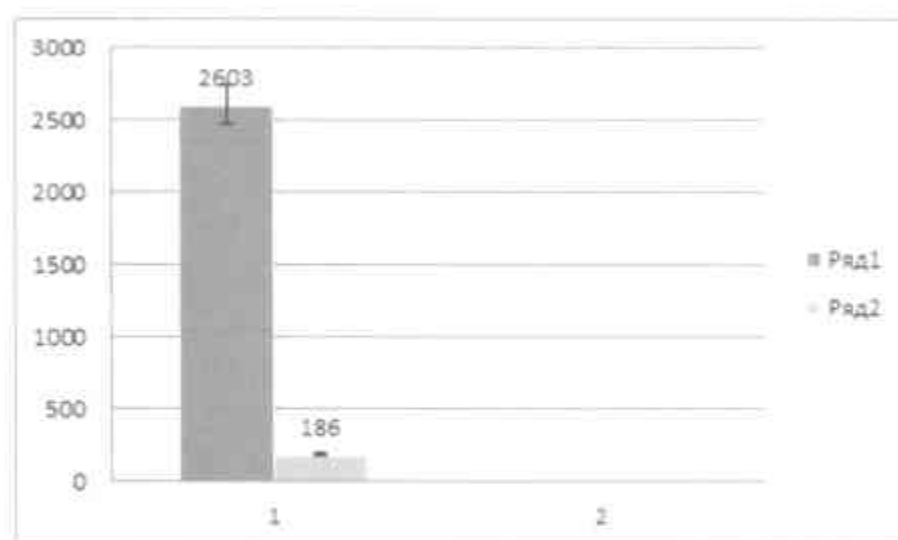


*Рисунок 16. Количество пациенток, направленных на FISH-исследование относительно количеству пациенток, направленных на ИГХ*

Результаты иммуногистохимического и генетического исследования обычно коррелируют между собой, а иммуногистохимического метода в большинстве случаев достаточно для определения статуса HER2 при раке молочной железы.

Из 186 случаев было выявлено 49 пациенток с положительным HER2-статусом, и 137 – с отрицательным (Рис.17). Это составило 10,2 % от общего числа случаев с неопределенным HER2-статусом, (2+).

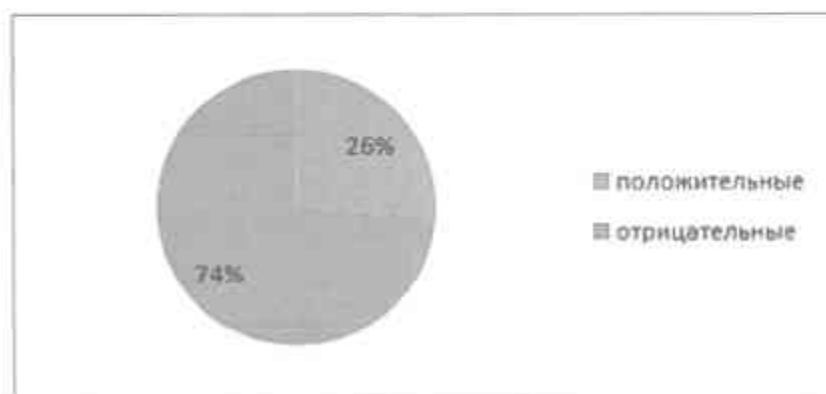


Рисунок 17. Процентное отношение положительного и отрицательного результатов FISH-исследования

После оценки результатов амплификации HER2 методом всем случаям была присвоена ISH-группа представленная в таблице 7 и рисунке 18. Все результаты FISH-исследования показаны на рисунках 18, 19, 20, 21 и 22.

Таблица 7 – Количество пациенток в соответствии с ISH группами

| 1 группа | 2 группа | 3 группа | 4 группа | 5 группа |
|----------|----------|----------|----------|----------|
| 25       | 3        | 23       | 40       | 95       |

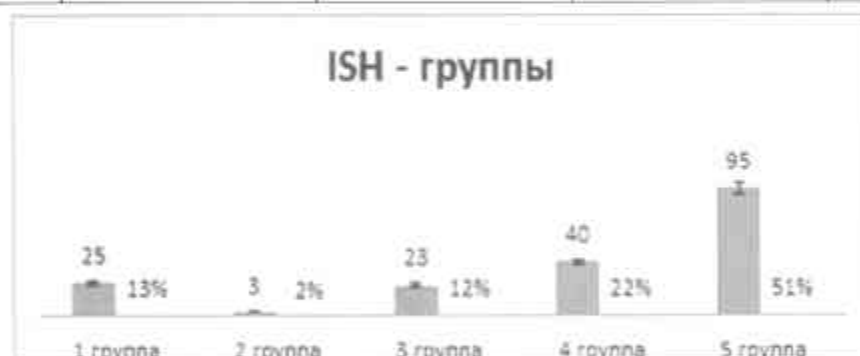


Рисунок 18. Процентное отношение пациенток в соответствии с ISH группами

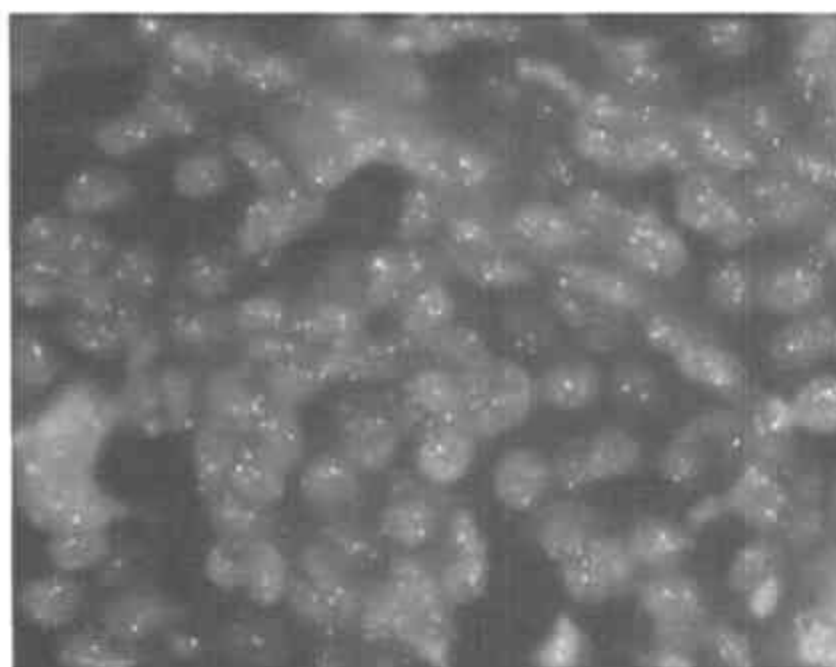
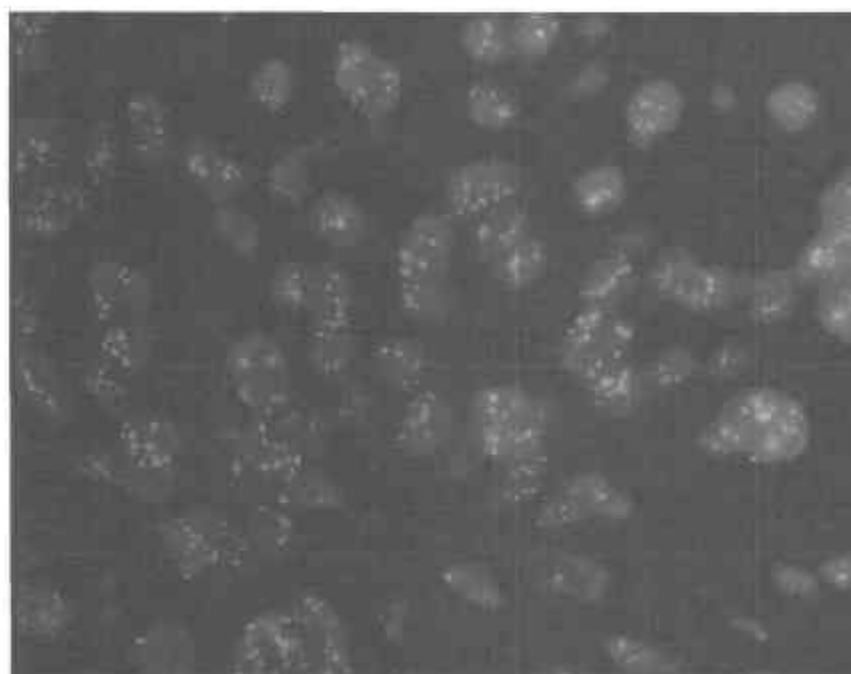


*Рисунок 19. Рак молочной железы. Амплификация гена HER2 (FISH, x1000), 1 группа.*

Соотношение HER2/CEP17  $\geq 2$

Среднее количество копий гена HER2  $\geq 4$  на клетку.

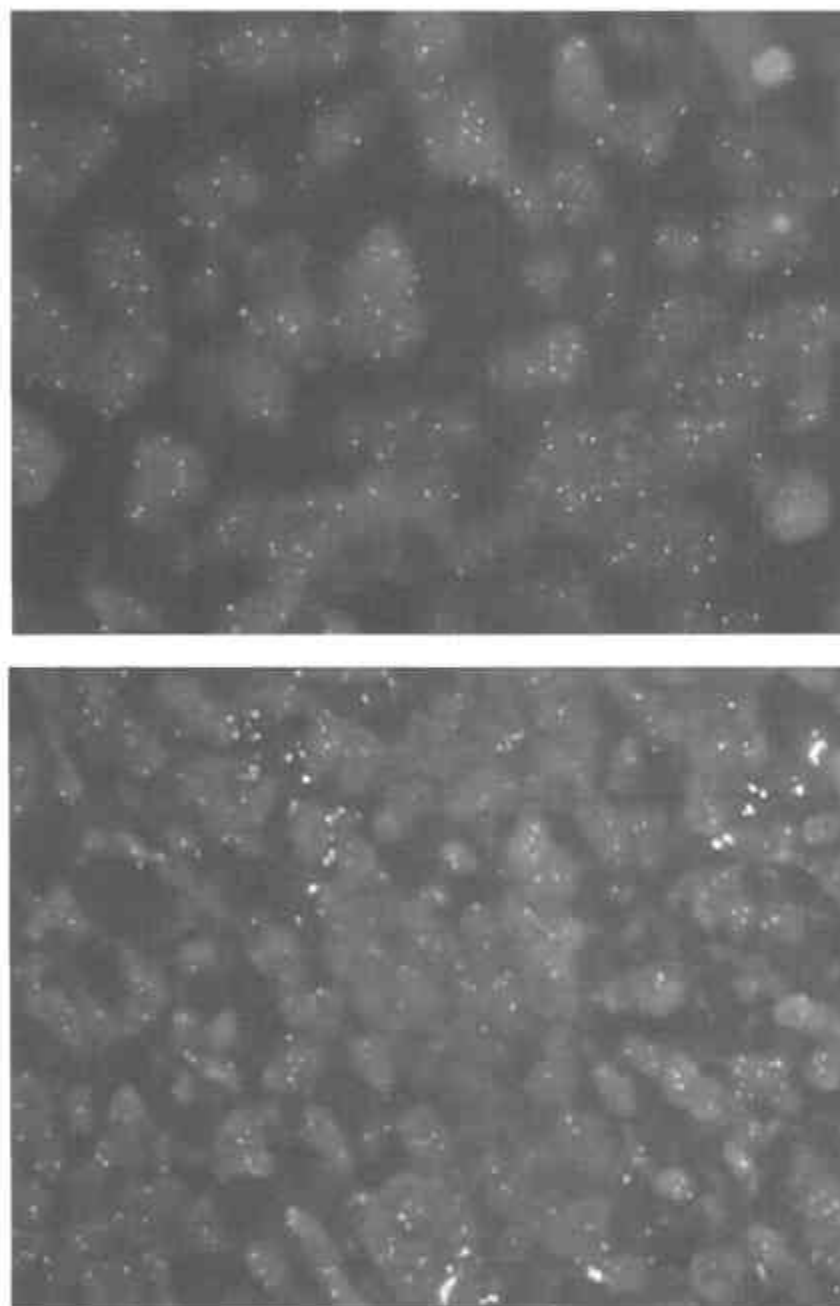


*Рисунок 20. Рак молочной железы. Отсутствие амплификации гена HER2 (FISH, x1000), 2 группа.*

Соотношение  $HER2/CEP17 \geq 2$

Среднее количество копий гена HER2  $\leq 4$  на клетку.

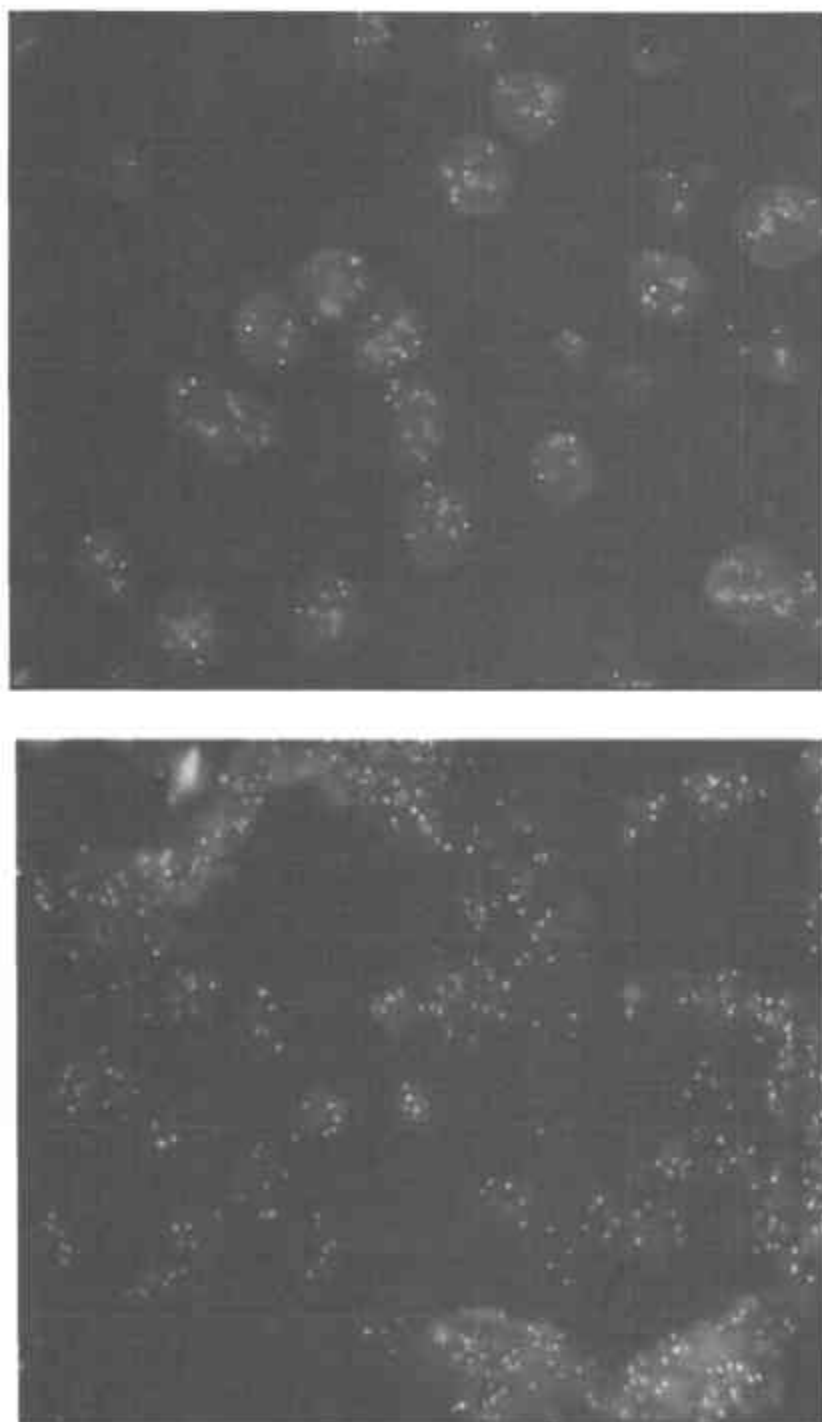


*Рисунок 21. Рак молочной железы. Амплификация гена HER2 (FISH, x1000), 3 группа.*

Соотношение HER2/CEP17  $< 2$

Среднее количество копий гена HER2  $\geq 6$  на клетку.

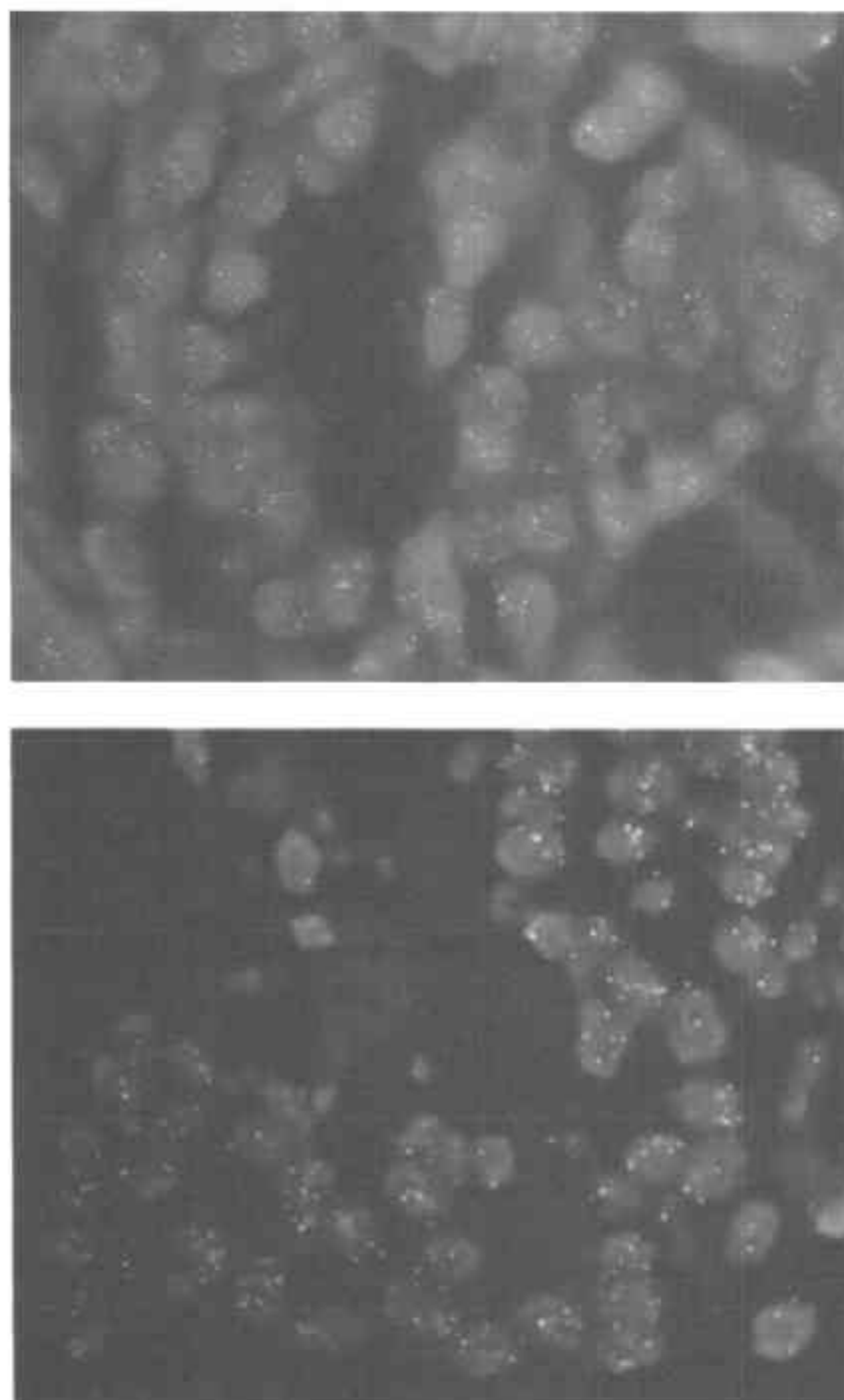


*Рисунок 22. Рак молочной железы. Отсутствие амплификации гена HER2 (FISH, x1000), 4 группа.*

Соотношение HER2/CEP17 < 2

Среднее количество копий гена HER2  $\geq 4$ , но < 6 на клетку.

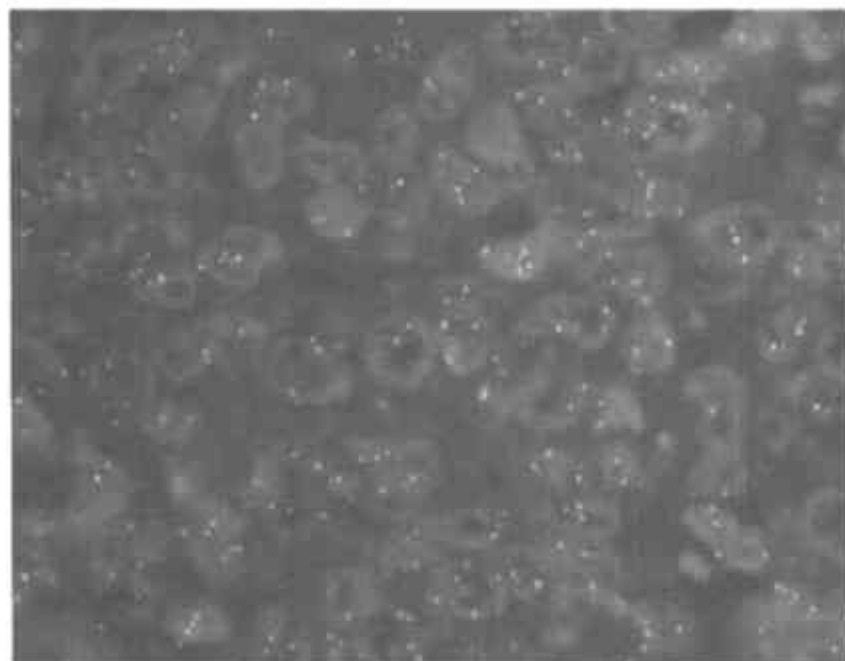
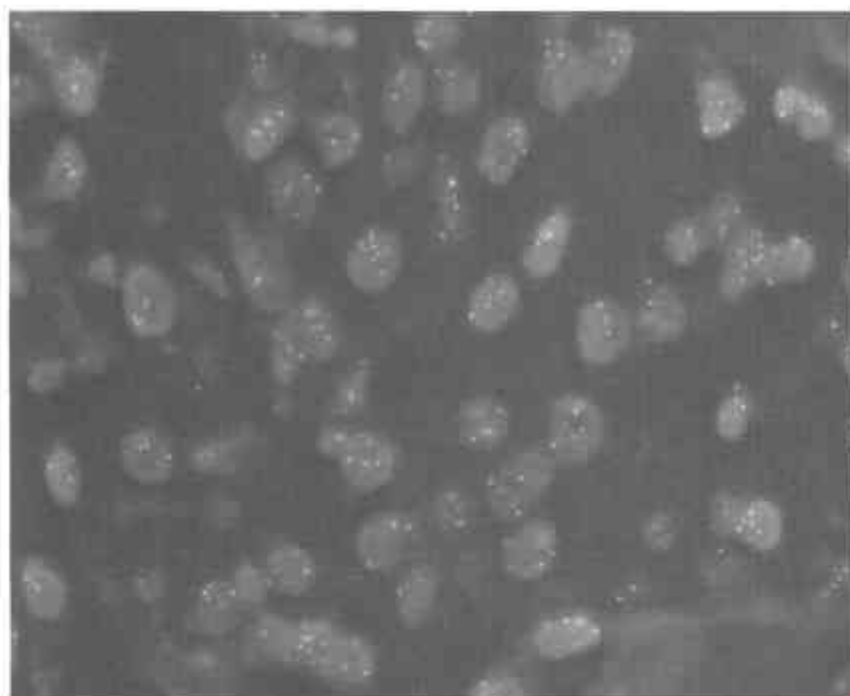


*Рисунок 23. Рак молочной железы. Отсутствие амплификации гена HER2 (FISH, x1000), 5 группа.*

Соотношение HER2/CEP17 < 2

Среднее количество копий гена HER2 < 4.

Было проанализировано множество данные исследований зарубежных авторов, целью которых было изучение HER2-статуса. Одни ученые делали упор на изучение групп пациентов с отрицательным HER2-статусом (1+) и неопределенным HER2-статусом, 2+) и отрицательным результатом гибридизации *in situ* (ISH). В результате было выявлено, что эти группы, вероятно, представляют собой опухоли со значительной биологической гетерогенностью. Дальнейшее изучение указанных групп поможет подобрать стратегии для таргетного лечения пациентов с раком молочной железы. Остаётся проблемой то, что пациентов с отрицательным HER2-статусом (1+) и неопределенным HER2-статусом, 2+) сложно идентифицировать. Поэтому информация о таких исследованиях крайне важна и необходима для дальнейшего анализа [42].

Целью других ученых было исследование 2 и 4 ISH-группы. В этих группах сравнивали методы лечения таких пациентов и результаты проведенной терапии. По данным их исследований рак 4-й ISH-группа, по-видимому, может образовать отдельную группу с промежуточными уровнями экспрессии белка, близкими к положительным или отрицательным значениям. Дополнительная информация о результатах лечения таргетным препаратом пациентов этой специальной группы может помочь в принятии решений о лечении этих пациентов [40]. Все исследования проводили в соответствии с рекомендациями ASCO 2018/CAP [59].

Основные изменения в рекомендациях 2018 г. коснулись уточнения так называемого неопределенного HER2-статуса (ИГХ 2+). Был качественно обновлен алгоритм HER2-исследования с использованием методики двухзондовой ISH и введена новая интерпретация результатов данного исследования [17].

В нашем исследовании был проведен анализ результатов определения белка Her2, с последующим уточнением статуса гена Her2/neu методом FISH у пациенток с неопределенным ИГХ-статусом рака молочной железы. После проведения FISH-исследования полученные результаты были

проанализированы и подсчитаны в соответствии рекомендациям. Каждый результат гибридизации *in situ* соответствует ISH-группе. Также был проведен анализ данных групп ASCO 2018/CAP. Полученные данные свидетельствуют от том, что особому вниманию подвергается 4 ISH-группа, так как результат достаточно сложно опередить и присвоить именно эту группу. Результаты зарубежных авторов схожи.

Несомненно, исследование амплификации и определение ISH – групп остается важным аспектом в изучении рака молочной железы и лечении пациенток с таким заболеванием.

### 3.3.2. Анализ мутационного статуса генов BRCA1/2 методом ПЦР у пациенток с РМЖ

За период с 13.01.2021 по 29.04.2022 у 347 пациенток моложе 50 лет с диагностированным раком молочной железы был проведен анализ мутационного статуса генов BRCA1/2 методом ПЦР. Исследование проводилось как у первичных пациентов, с целью диагностики заболевания так и для определения тактики лечения пациенток.

Из них у 17 пациенток был выявлен положительный результат, что составило 4,9% от всех, кому был назначен данный анализ (Рис.23).

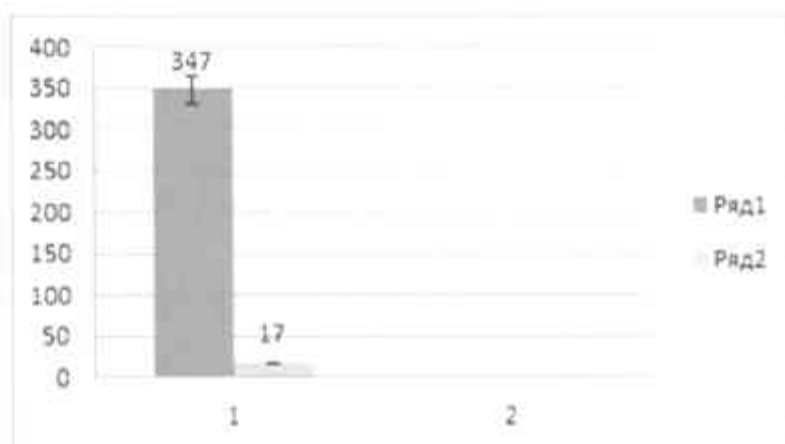


Рисунок 24. Результат анализа мутационного статуса гена BRCA1/2 методом ПЦР у пациенток с РМЖ

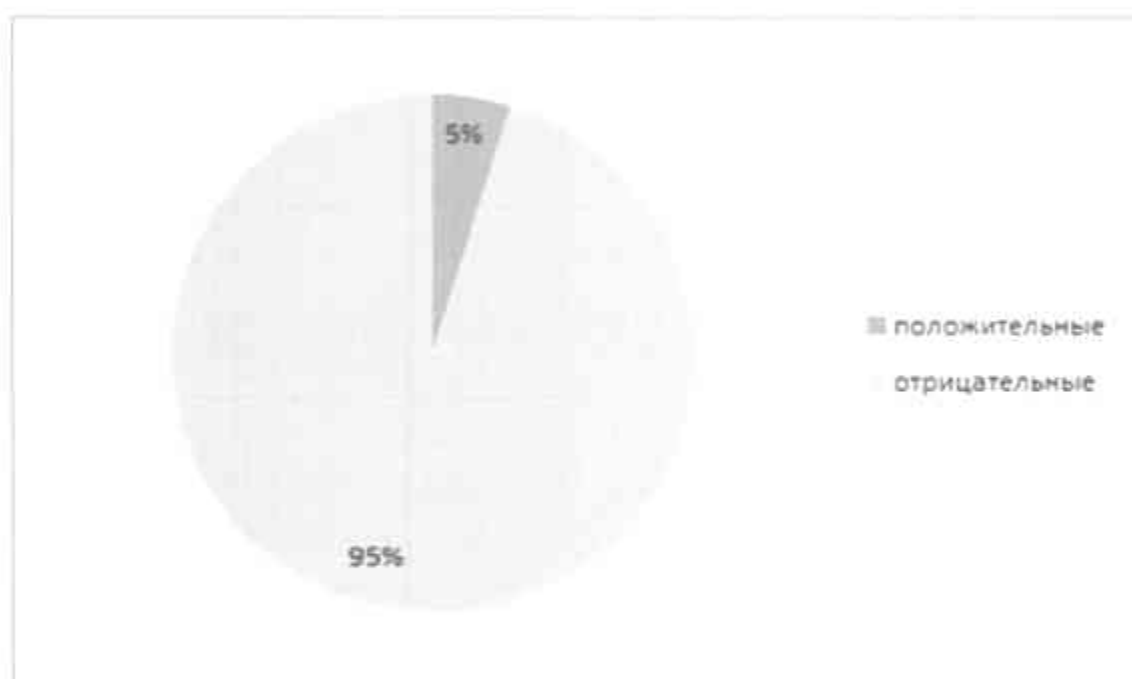


*Рисунок 25. Результат анализа мутационного статуса гена BRCA1/2 методом ПЦР у пациентов с РМЖ (процентное отношение положительного и отрицательного результатов)*

Из 17 положительных были выявлены 3 различные мутации в гене BRCA1/2. Результаты представлены на рисунке 24, 25 и в таблице 8.

*Таблица 8 – Выявленные мутации в гене BRCA1/2*

| Название             | Количество пациенток |
|----------------------|----------------------|
| 538insC (c/5266dupC) | 18                   |
| T300G                | 1                    |
| 415delA              | 2                    |

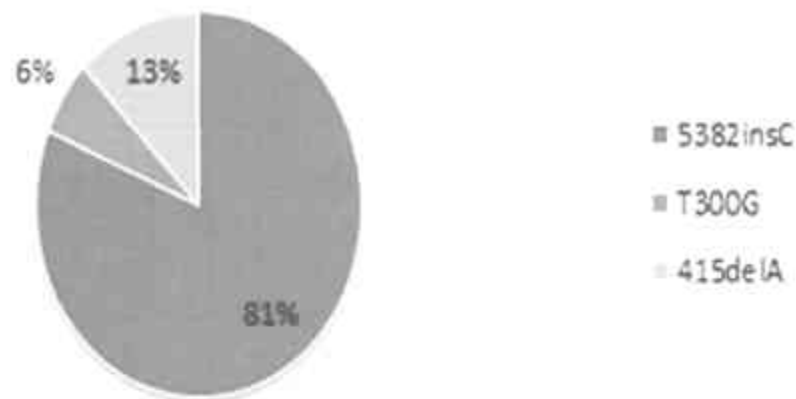


Рисунок 26. Процентное отношение мутаций, выявленных в гене *BRCA1/2*

По полученным данным мутация 5382 insC, заключающаяся в добавлении (инсерции) одного нуклеотида – цитозина в позиции 5382 является наиболее распространённой среди пациенток с РМЖ, выявленным в возрасте до 50 лет.

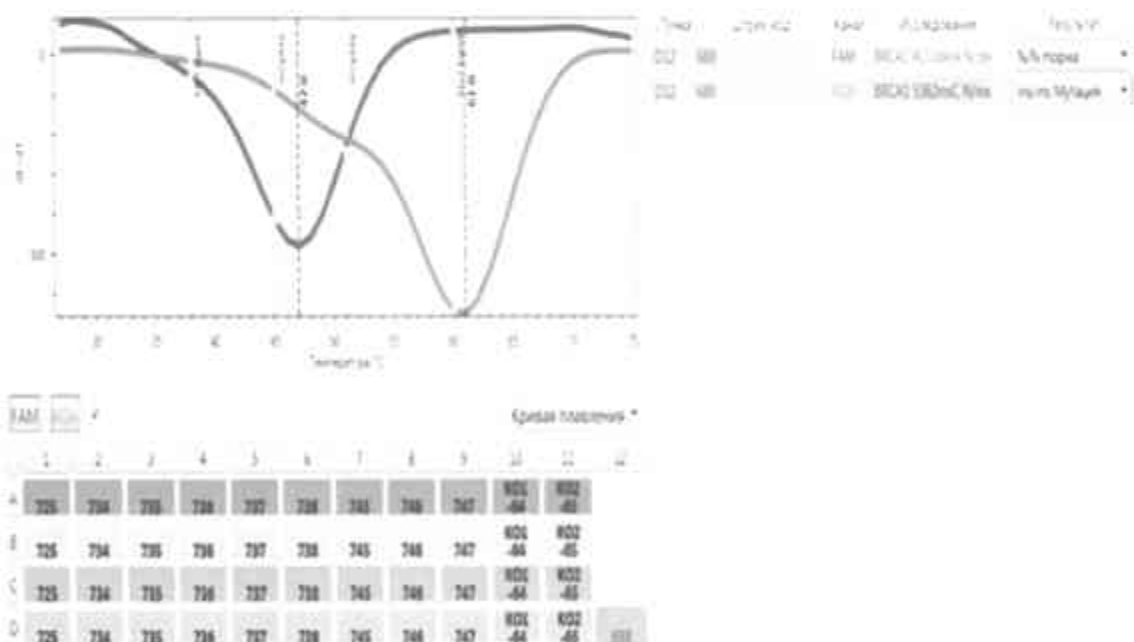


Рисунок 27. График результата анализа мутационного статуса гена *BRCA1/2* методом ПЦР у пациентов с РМЖ (выявлена мутация)

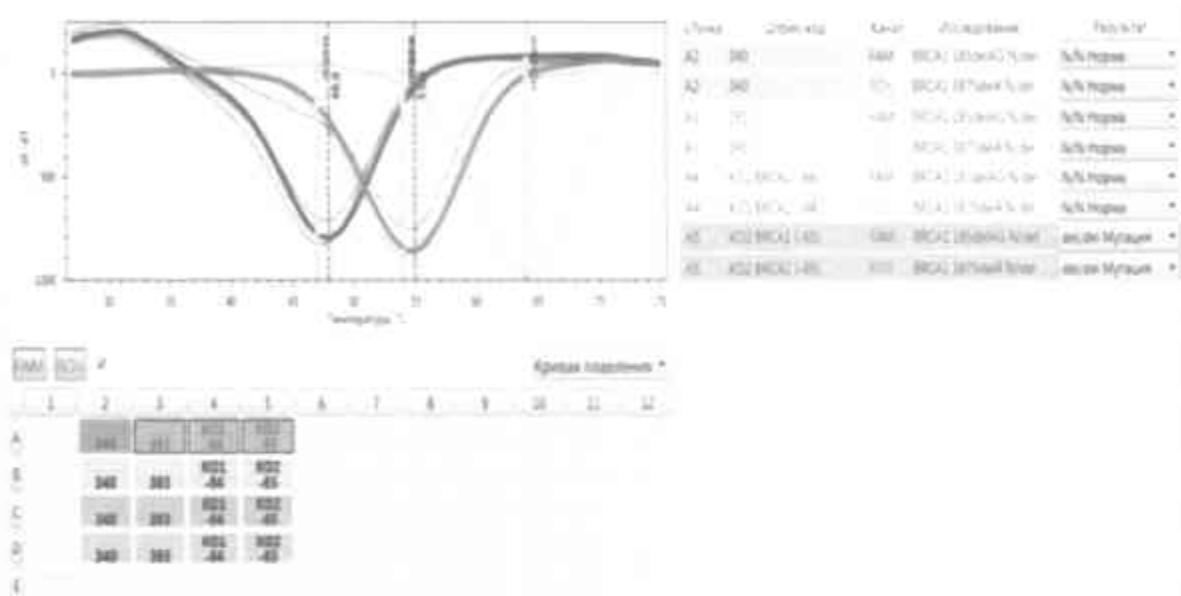


Рисунок 28. График результата анализа мутационного статуса гена BRCA1/2 методом ПЦР у пациентов с РМЖ (мутация не выявлена)

Многочисленные этногенетические исследования подтверждают вовлеченность разных полиморфизмов генов BRCA1 и BRCA2 в канцерогенез, поэтому их часто относят к генам-маркерам спорадических и семейных форм ЗНО [38]. К высокопенетрантным герминальным мутациям относят 185delAG, 5382insC, 300T>G (C61G), 4154delA в гене BRCA1 и 6174delT в BRCA2.

Было проанализировано несколько статей российских исследователей. Во всех исследованиях было выявлено, что в Америке, Африке, Восточной, Центральной Европе, в том числе и в России (Центральный и Сибирский регионы) у женщин, больных раком молочной железы чаще выявляются 185delA и 5382insC мутации гена BRCA1. Для Австралии, Японии, Китая и Северной Европы характерны высокие частоты мутаций BRCA1, не встречающиеся в других регионах мира [22].

По данным ученых из России, исследовавших русских женщин с раком молочной железы выявленном в возрасте до 50 лет, у 193 была обнаружена

мутация c.5266dupC (также известная как 5382insC или 5385insC) (4,7 %) [31].

В исследовании других российских ученых, которые провели скрининг 306 женщин, больных раком молочной железы моложе 50 лет было обнаружено 25 мутаций BRCA1 (18 случаев 5382insC и 7 случаев 300 T> G).

Определено, что мутация 5382insC является фактором генетической предрасположенности к раку молочной железы, что согласуется с сообщениями из других стран [52].

Исследования зарубежных авторов также показывают, что мутации генах BRCA1 и BRCA2, повышают риск развития рака молочной железы. Эти наследуемые мутации неравномерно распределены среди популяций с разным этническим [33].

Результаты данного исследования показывают, что мутация 5382insC наиболее часто встречается у женщин, больных раком молочной железы в возрасте до 50 лет, что совпадает с данными других исследователей из России и учеными из других стран. Мутация 415delA встречается реже, что также совпадает с результатами других исследований. По результатам исследований российских и зарубежных ученых мутация T300G наименее выявляемая среди женщин с раком молочной железы.

В нашем исследовании данная мутация составила наименьший процент от всех выявленных мутаций, что соответствует данным исследований других авторов.

Так как результаты нашего исследования совпадают с результатами разных авторов, можно говорить о том, что была правильно сделана выборка, посчитаны данные и верно определены мутации в гене BRCA1/2 (Рис.26, 27).

### 3.3.3 Анализ мутационного статуса генов PIK3CA методом ПЦР у пациентов с РМЖ

За период с 13.01.2021 по 29.04.2022 142 пациентки с Люминальным типом рака исследовались на PIK3/CA методом ПЦР. Исследование проводилось как у первичных пациентов, с целью диагностики заболевания и для определения тактики лечения пациентки.

Из 142-х пациенток у 62 был выявлен положительный результат, что составило 43,7 % от всех, кому был назначен данный анализ (Рис.28, 29).

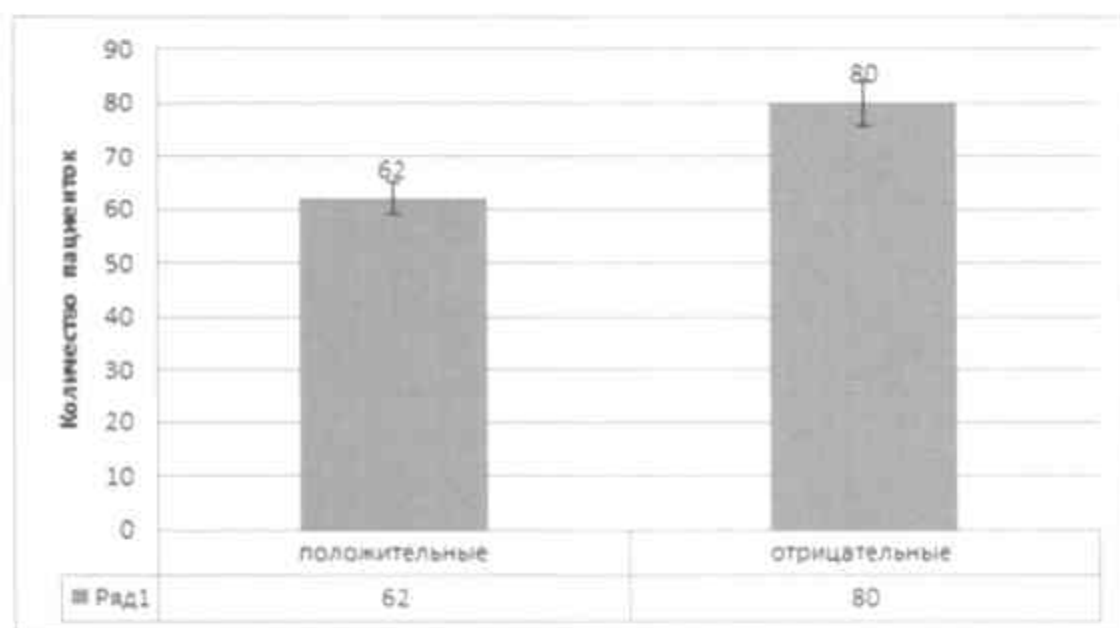


Рисунок 29. Результат анализа мутационного статуса гена PIK3/CA методом ПЦР у пациентов с РМЖ

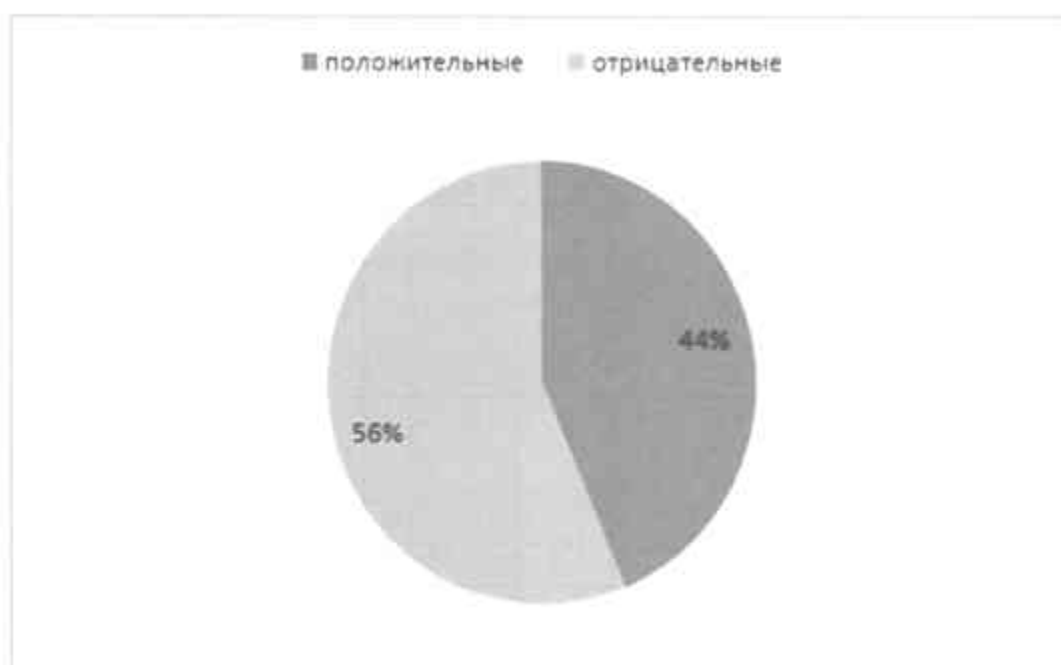


*Рисунок 30. Результат анализа мутационного статуса гена PIK3CA методом ПЦР у пациентов с РМЖ (процентное отношение положительного и отрицательного результатов)*

Были выявлены 8 различных мутаций в гене PIK3CA. Результаты представлены в таблице 9 и рисунке 30.

*Таблица 9 – Выявленные мутации в гене PIK3CA*

| Название     | Количество пациенток |
|--------------|----------------------|
| C420R        | 2                    |
| E542K        | 7                    |
| E545R        | 11                   |
| H1047R       | 36                   |
| H1047R, R88Q | 1                    |
| M1043I       | 1                    |
| N345K        | 3                    |
| Q546X        | 1                    |

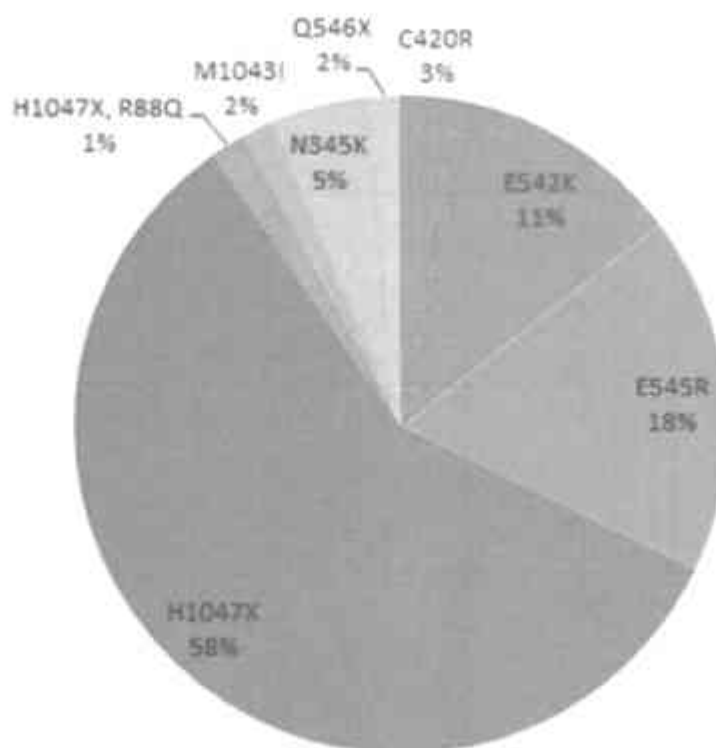


Рисунок 31. Процентное отношение мутаций, выявленных в гене PIK3CA

По результатам исследования российских авторов изучающих мутации в гене PIK3CA в выборке из 206 женщин с распространенным ER+/HER2 раком молочной железы были определены мутации в 7, 9 и 20-м экзонах гена PIK3CA. Мутации в гене PIK3CA детектированы в 62 из 206 (30%) случаев. Примечательно, что абсолютное большинство выявленных повреждений (59 из 62, 95%) представлено всего тремя частыми разновидностями миссенс-замен: p.E542K, p.E545K и p.H1047R [32, 34].

Исследование зарубежных авторов показало, что у 35,7% (выборка из 6338 женщин, 2261 с мутацией в гене PIK3CA) женщины, больных раком молочной железы выявлены мутации в гене PIK3CA. Наиболее часто встречаемыми оказались мутации H1047R (35%), E545K (17%), E542K (11%), N345K (6%) и H1047L (4%). Пациентки, имеющие двойную мутацию составили 5% [24].

Были проанализированы различные статьи, в которых результаты оказались схожими.

В нашем исследовании, как и в исследованиях других авторов, самой частой является мутация Н1047Х. На другие мутации приходится более низкий процент выявляемости. Также 1% составила двойная мутация. Полученные данные согласуются с опубликованными данными о частоте повреждений РІКЗСА.

Такой результат говорит о том, что в нашем исследовании была правильно сделана выборка, посчитаны данные и верно определены мутации в гене РІКЗСА.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения магистерской работы был проведен анализ биохимических и молекулярно-генетических маркеров рака молочной железы. Проанализирован и обобщен российский и зарубежный опыт по изучению данной темы.

Исходя из полученных результатов можно сделать следующие **выводы:**

1) Выявлено, что возможность использования двух методов - ИГХ и гибридизации *in situ* для определения белка Her2, с последующим уточнением статуса гена Her2/neu и установления ISH-групп дает наиболее полную картину патологического процесса, позволяя оценить как морфологические характеристики объекта исследования, так и количественно интерпретировать экспрессию HER2. Определение экспрессии онкобелка HER-2neu и выявление взаимосвязи полученных данных с клиничко-морфологическими характеристиками РМЖ позволит определить прогностическую значимость HER-2neu и выбрать оптимальный метод диагностики и лечения (таргетная терапия) злокачественного новообразования.

2) Отмечено, что в ходе анализа мутационного статуса генов BRCA1/2 методом ПЦР у 4,9% пациенток с РМЖ, выявленном до 50 лет обнаружены наиболее частые варианты мутаций, такие, как инсерции и делеции. Ранний возраст пациенток с положительным результатом BRCA1/2 может говорить о наследственном характере заболевания. Данный вид анализа может помочь в своевременном скрининге и определении статуса BRCA1/2 потенциальным носителям мутаций в этом гене. Результат анализа поможет подобрать тактику лечения пациенток с РМЖ.

3) Установлено, в ходе анализа мутационного статуса генов PIK3CA почти половина женщин (43,7%) с РМЖ, что говорит о высокой частоте соматических aberrаций PIK3CA. Полученные данные о спектре мутаций

PIK3CA могут быть использованы при планировании клинических исследований ингибиторов PI3K и организации молекулярно-генетического тестирования больных РМЖ. Знание о наличии мутации PIK3CA позволит планировать последующую терапию с применением таргетных препаратов, блокирующих PI3K.

## **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

ЗНО – злокачественное новообразование

МЖ – молочная железа

нРМЖ – немелкоклеточный рак молочной железы

РМЖ – рак молочной железы

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автомонов Д. Е., Пароконная А. А., Любченко Л. Н., Нечушкин М. И., Поспехова Н. И. Клинико-морфологические характеристики и прогноз BRCA – ассоциированного рака молочной железы у женщин репродуктивного возраста // Опухоли женской репродуктивной системы. 2012. №1. С.20-23.
2. Алясова А. В. Заболевания молочной железы. Профилактика и методы лечения // Центрполиграф. 2016. С. 602.
3. Аксель Е.М. Злокачественные новообразования молочной железы: состояние онкологической помощи, заболеваемость и смертность // Маммология. 2006. №1. С. 9-13.
4. Аникеева Н. В. Роль рецепторов эстрогенов, прогестерона, андрогенов, онкобелка HER-2, антигена Ki-67 в прогнозе рака молочной железы // Москва. 2006. С. 58.
5. Апанович Н. В., Шубин В. П., Коротаева А. А. Современные молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. 2011. №1. С.19-28.
6. Астрель Х. Ю. Нарушения молочных желез. Менопауза. Плакат. Харвест. 2015. С.375.
7. Богатырева В. Н., Комова Д. В., Хайленко В. А. Диагностика рака молочной железы // М. МИА. 2005. С. 240.
8. Волченко Н. Н. Морфологические факторы прогноза при раке молочной железы // Медицинские науки. 1998. С.123.
9. Высоцкой И. В. Клинические и морфопрогностические особенности редких гистологических типов рака молочной железы // СИНТЕГ. 2015. С.242.
10. Дмитриев В. Н., Сухотерин И. В., Зыбенко И. И., Дмитриева Т. В. Мутации генов BRCA1, BRCA2 // Опухоли женской репродуктивной системы. 2012. №1. С.13-16.

- 11.Зикиряходжаев А. Д. Рак молочной железы у женщин молодого возраста // Медицинские науки. 2007. С.38.
- 12.Имянитов Е. Н. Наследственный рак молочной железы // Практическая онкология. 2010. № 11. С. 258-266.
- 13.Кулигина Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы // Практическая онкология. 2010. №4. С.203-216.
- 14.Летягин В. П., Лактионов В. П., Высоцкая И. В., Котов В. А. Рак молочной железы // Эпидимиология, классификация, диагностика, лечение, прогноз. 1996. С.150.
- 15.Летягин В. П. Опухоли молочной железы (клиника, диагностика, лечение, прогноз) // Москва. 2000. С.266.
- 16.Любимова Н. В., Кушлинский Н. Е., Герштейн Е.С. Биологические маркеры опухолей: методические аспекты и клиническое применение // Вестник Московского онкологического общества. 20011. С.52.
- 17.Мирюсупова Г. Ф., Г. А. Хакимов, Н. Р. Шаюсупов Клинические характеристики HER2-позитивного рака молочной железы // Вопросы онкологии. 2017. № 4. С. 657-659.
- 18.Петров С. В. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека // Казань. 2018. С. 456.
- 19.Поспехова Н. И. Комплексный анализ наследственной формы рака молочной железы и/или яичников: молекулярногенетические и фенотипические особенности наследственной формы рака молочной железы // Вопросы онкологии. 2017. № 8. С. 468.
- 20.Сабиров А. Х. Молекулярно-биологические маркеры рака молочной железы // Вопросы онкологии. 2016. С. 240.
- 21.Сазонов, С. В. ИГХ диагностика рака молочной железы // Казань. 2017. С. 140.
- 22.Семиглазов В. Ф., Палтуев Р. М., Семиглазов В. В. Общие рекомендации по лечению раннего рака молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. 2015. №11. С. 43–60.

23. Семиглазов В. Ф. Стратегические и практические подходы к решению проблемы рака молочной железы // Вопросы онкологии . 2012. №2. С. 148-152.
24. Семиглазов В. Ф. Эпидемиология и скрининг рака молочной железы // Вопросы онкологии. 2017. № 3. С. 375-383.
25. Соколова Т. Н., Алексахина С. Н., Янус Г. А., Султанбаев А. В. Частота и спектр мутаций PIK3CA при гормонозависимом HER2-отрицательном распространенном раке молочной железы у российских пациенток // Современная онкология. 2019. С.115.
26. Часовникова О. Б. Анализ встречаемости девяти мутаций в генах BRCA1 и BRCA2 у больных раком молочной железы в Сибирском регионе // Сибирский онкологический журнал. 2010. № . С. 32-35.
27. Чиссова В. И. Злокачественные новообразования в России (Заболеваемость и смертность): стат. Сборник // Центр информ. техн. и эпидемиол. исследований в области онкологии. 2012. С. 262.
28. Якупова К. И., Князева О. А. Онкомаркеры в диагностике онкологических заболеваний // Научное обозрение. Педагогические науки. 2019. № 5-3. С. 126-129.
29. Amy M. B., Stankowski R. V. Breast cancer biomarkers: risk assessment, diagnosis, prognosis, prediction of treatment efficacy and toxicity, and recurrence // Curr Pharm Des. 2014 №20. P.879-98.
30. André F. M., Ciruelos E.M., Juric D. Alpelisib plus fulvestrant for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative advanced breast cancer // Ann Oncol. 2021. №32. P. 208–17.
31. Anderson E.J., Mollon L.E., Dean J.L. Systematic Review of the Prevalence and Diagnostic Workup of PIK3CA Mutations in IIR+/HER2- Metastatic Breast Cancer // Int J Breast Cancer. 2020. P. 179.
32. Bang Y.J., Van C. E., Feyereislova A. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive

- advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial // Lancet. 2010. P. 687-697.
- 33.Carvajal-Hausdorf D.E. Measurement of domain-specific HER2 (ERBB2) expression may classify benefit from trastuzumab in breast cancer // J. Natl Cancer Inst. 2015. P. 36.
- 34.Cizkova M., Vacher S., Meseure D. PIK3R1 underexpression is an independent prognostic marker in breast cancer // BMC Cancer. 2013. №13. P. 545.
- 35.Dawood S., Broglio K., Buzdar A. U., Hortobagyi G. N., Giordano S. H. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review // J Clin Oncol. 2010. №28. P. 92.
- 36.Dietel M., Ellis I. O., Höfler H. Comparison of automated silver enhanced in situ hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma // American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. 2017. №1. P. 19-25
- 37.Finch A., Beiner M., Lubinski J., Lynch H. T., Moller P., Rosen B. Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation // JAMA. 2006. №26. P. 185-92.
- 38.Gupta S., Macrodissection prior to closed system RT-qPCR is not necessary for estrogen receptor and HER2 concordance with IHC/FISH in breast cancer // Lab. Invest. 2018 №98. P. 1076-1083.
- 39.Harris L. N., Ismaila N., McShane L. M. Use of biomarkers to guide decisions on adjuvant systemic therapy for women with early-stage invasive breast cancer // Clin Oncol. 2016. №34. P. 1134-50.
- 40.Josef R. F., Iris N., Bharat J., Stoss O. ISH-based HER2 diagnostics // Pathologe . 2020. №41. P. 606-613.
- 41.Lehmann B. D., Bauer J. A., Schafer J. M., PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the

- combination of PI3K and androgen receptor inhibitors // *Breast Cancer Res.* 2014. №16. P. 406.
42. Meric-Bernstam F., Johnson A. M., Dumbrava E. E. Advances in HER2-targeted therapy: novel agents and opportunities beyond breast and gastric cancer // *Clin Cancer Res.* 2019. №25. P. 2033-2041.
43. Panigrahi M. K., Kumar D., Mehta A., Saikia K. K. Outcome of HER2 Testing by FISH applying ASCO/CAP 2007 and 2013 guideline in IHC equivocal group of breast cancer: experience at tertiary cancer care centre // *South Asian J Cancer.* 2017. № 6. P. 45-46.
44. Pascual J., Lim J. S., Macpherson I. R. Triplet Therapy with Palbociclib, Taselisib, and Fulvestrant in PIK3CA-Mutant Breast Cancer and Doublet Palbociclib and Taselisib in Pathway-Mutant Solid Cancers // *Cancer Discov.* 2020. №56. P. 68.
45. Petrucelli N., Daly M. B., Feldman G. L. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer // *Breast.* 2015. №24.26–35.
46. Chambers P. B. Mutations in BRCA1 and BRCA2 // *Genet Med.* 2010. №12. P. 245-59.
47. Gupta S., Neumeister V., McGuire J., Song Y. S., Acs B. Quantitative assessments and clinical outcomes in HER2 equivocal 2018 ASCO/CAP ISH group 4 breast cancer // *NPJ Breast Cancer.* 2019. №29. P. 28.
48. Richman S. D., Southward K. HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials // *J Pathol.* 2016. №238. P. 562-570.
49. Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J. S., Nobel A. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018. №100. P. 23.
50. Subramanian J. Emergence of ERBB2 mutation as a biomarker and an actionable target in solid cancers // *Oncologist.* 2019. №2. P. 1-12.

51. Tong Y. Can breast cancer patients with HER2 dual-equivocal tumours be managed as HER2-negative disease? // Eur. J. Cancer. 2018. №89. P. 9-18.
52. Wang Y. BASC, a super complex of BRCA1 associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures // Genes Dev. 2000. №14. P. 927-939.
53. Vuong D., Simpson P.T., Green B. Molecular classification of breast cancer // Virchows Arch. 2014. №4. P. 1-14.
54. Waks A. G., Winer E. P. Breast Cancer Treatment: A Review // JAMA 2019. №321. P. 288-300.
55. Wolff A. C., Hammond M. H., Allison K. H. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology // College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. J Clin Oncol. 2018. № 36. P.105-106.
56. Yoshida H., Shimada K., Kosuge T., Hiraoka N. A significant subgroup of resectable gallbladder cancer patients has an HER2 positive status // Virchows Arch. 2016. №46. P. 431-439.
57. Zhang H., Katerji H., Turner B. M., Hicks D. G. HER2-Low Breast Cancers // Am Clin Pathol. 2022. №3. P. 328-336.
58. Zhao X., Rødland E.A., Tibshirani R., Plevritis S. Molecular subtyping for clinically defined breast cancer subgroups // Breast Cancer Res. 2015. №17. P. 29.
59. Рак молочной железы / ASCO. Режим доступа: <https://www.asco.org/practice-patients/guidelines/breast-cancer>
60. Диагностическое медицинское оборудование, лабораторное оборудование. Режим доступа: <https://biovitrum.ru/catalog/morfologiya/immunogistohimiya/immunostejner>