

А.Е. Васильев¹, Г.А. Янус^{2, 3}, Е.Н. Сустицын^{2, 3}, А.Г. Иевлева^{2, 3}, Т.Н. Соколова³,
И.В. Бизин³, А.П. Соколенко^{2, 3}, Е.В. Преображенская^{2, 3}, В.И. Ни³, Т.А. Лайдус³,
С.А. Чуйнышена², Ю.А. Горгуль², С.Н. Алексахина³, А.А. Михетько³, Е.Н. Имянитов^{2, 3, 4}

Случай рака молочной железы у носительницы патогенной мутации в гене *PMS2*

¹ ГБУЗ ООКОД, г. Оренбург

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург

³ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова», Санкт-Петербург

⁴ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург

Рак молочной железы (РМЖ) — нетипичное проявление для синдрома Линча. Вопрос о степени риска развития РМЖ у носительниц патогенных мутаций в генах синдрома Линча (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) остается открытым. Кроме того, известно, что часть новообразований молочной железы у больных этим синдромом патогенетически связана с наследственной мутацией, а часть возникает совершенно независимо от наследственных дефектов генов системы репарации неспаренных оснований ДНК. При случайном обнаружении таких мутаций у больных РМЖ каждый раз требуется тщательная дифференциальная диагностика между этими категориями опухолей, причем вопрос этот носит сугубо практический характер, так как могут потребоваться изменения в тактике лечения. В данной работе приведено описание клинического случая РМЖ, возникшего у носительницы патогенной мутации в гене *PMS2*, выявленной случайно. Приведено описание молекулярно-генетических методов: анализа микросателлитных маркеров, выявления «потери гетерозиготности», позволивших в данном наблюдении отнести новообразование к категории случаев, развившихся вне всякой связи с имеющимся у пациентки синдромом Линча.

Ключевые слова: аденокарцинома, рак молочной железы, микросателлитная нестабильность, «потеря гетерозиготности», *PMS2*, синдром Линча, система репарации неспаренных оснований ДНК

Введение

Несмотря на более чем столетнюю историю изучения синдрома Линча (наследственного неполипозного рака толстой кишки), многие аспекты клинической картины этого заболевания все еще остаются недостаточно изученными.

В частности, остаётся непонятным, следует ли включать в спектр ассоциированных с синдромом Линча опухолей рак молочной железы (РМЖ). Некоторые эпидемиологические исследования отмечают повышение риска РМЖ при этом синдроме, по крайней мере среди носительниц патогенных мутаций в генах *MSH6* и *PMS2* [1, 2, 3]. Более того, среди когорт больных РМЖ наиболее часто встречаются мутации именно в последнем гене, наименее пенетрантном в отношении «классических» Линч-ассоциированных неоплазм (рака толстой кишки, рака эндометрия, рака яичников и рака желудка) [4]. Важно, что существование псевдогена, чрезвычайно схожего с 3'-концевым участком *PMS2*, весьма затрудняет диагностику наследственных вариантов этого гена. Поэтому лишь в последние годы стало очевидно, что популяционная встречаемость мутаций в сравнительно низкопенетрантных *MSH6* и особенно *PMS2* (~1:700) существенно превышает свойственную для более высокопенетрантных генов *MLH1* и *MSH2* [5]. Исследования, выполнявшиеся на крупных когортах носителей мутаций *PMS2* и их родственников, значимого повышения риска РМЖ не показали, а высокая частота патогенных вариантов в *PMS2* у больных РМЖ может объясняться сравнительно высокой встречаемостью этих дефектов у здоровых людей [6].

Другая сторона данного вопроса — насколько опухоли РМЖ, возникшие у гетерозиготных носительниц наследственных мутаций в генах синдрома Линча (*MLH1*, *MSH2* (EPCAM), *MSH6*, *PMS2*), характеризуются чертами, типичными для Линч-ассоциированных новообразований. В самом деле, изучение синдрома Линча и его спорадических «фенокопий» — раков, ассоциированных с метилированием промотора в гене *MLH1*, позволило выявить один из первых известных специфических «мутационных профилей»: микросателлитную нестабильность,

microsatellite instability (MSI) [7]. Возникающая в клетке-предшественнице опухолевого клона дисфункция системы репарации неспаренных оснований (deficiency of DNA mismatch repair, dMMR) приводит к утрате способности клетки исправлять ошибки ДНК-полимеразы при копировании генома. Это ведет к накоплению в опухолевом геноме огромного количества как точковых мутаций, так и характерных выпадений/вставок в участках длинных одинаковых повторов одного или нескольких нуклеотидов, т.н. микросателлитных повторов — действительно, полимеразы нередко «соскальзывает», копируя такие участки. Известен целый ряд подобных микросателлитных треков, очень часто подвергающихся альтерации в случае дисфункции MMR — они служат маркерами неоплазм с высоким уровнем микросателлитной нестабильности (MSI-H) [8]. Как правило, в рамках синдрома Линча опухоли развиваются по классическому двухударному механизму: у гетерозиготных носителей наследственной мутации в гене MMR второй аллель повреждается за счет «потери гетерозиготности» (хромосомной перестройки, устраняющей часть или всю копию гена «дикого типа») или за счет точковой соматической мутации [9]. Это явление обычно сопровождается потерей ядерной белковой экспрессии утраченного полностью гена и может быть выявлено при помощи иммуногистохимии [10]. Оказалось, что все эти особенности свойственны лишь приблизительно половине случаев РМЖ, возникающих у носительниц патогенных аллелей, ассоциированных с синдромом Линча; в иных ситуациях патогенез новообразования, по-видимому, никак не связан с носительством наследственной мутации [11, 12, 13].

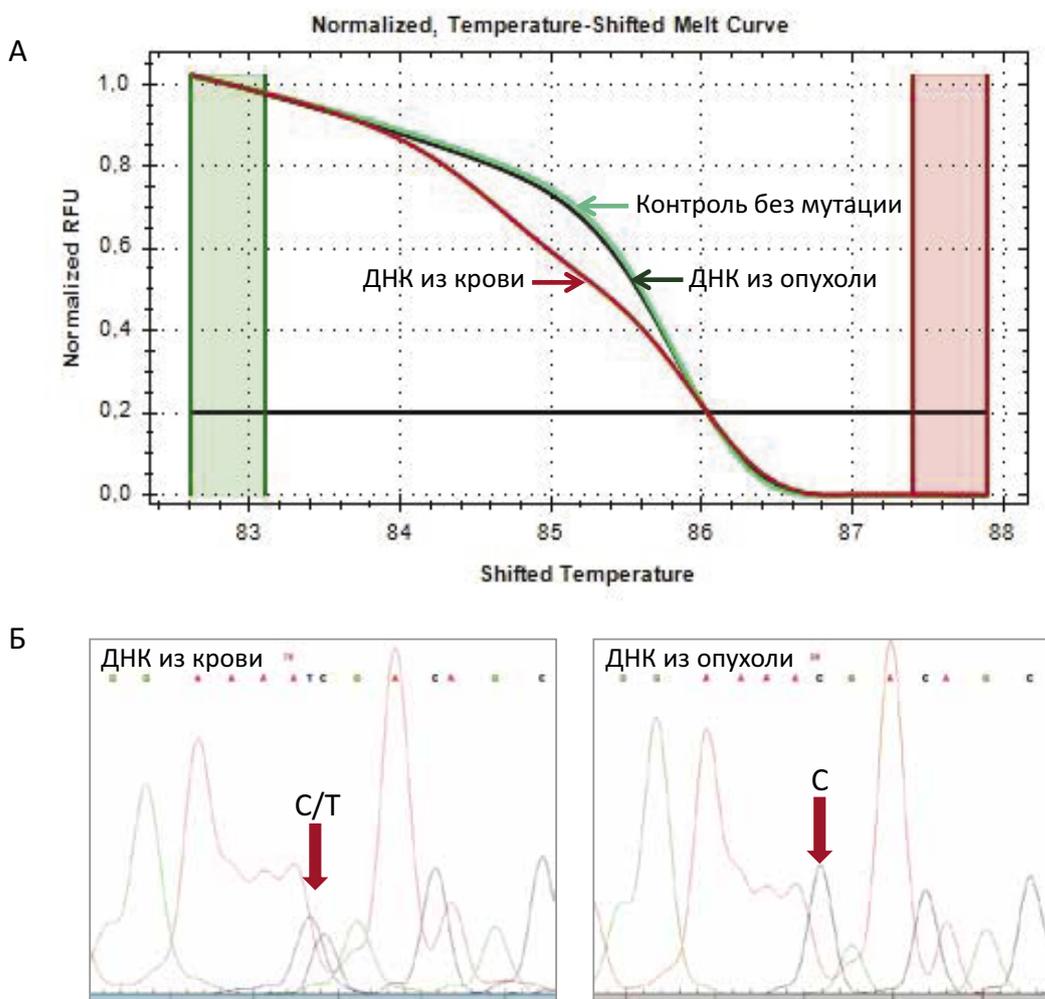
В последние годы этот аспект проблемы приобрел несомненное практическое значение. Гипермутабельность неоплазм, демонстрирующих феномен микросателлитной нестабильности, почти неизбежно сопряжена с их иммуногенностью. Одним из знаменательных достижений в лекарственной противоопухолевой терапии за последнее десятилетие стало внедрение ингибиторов контрольных точек иммунного ответа в стандарты лечения новообразований с дисфункцией MMR [14]. Вместе с тем, при РМЖ анализ опухолевого материала на предмет наличия микросателлитной нестабильности не является стандартом, так как обнаружение MSI-H фенотипа в спорадических РМЖ — большая редкость [15]. Однако случайное выявление наследственной мутации в гене, ассоциированном с синдромом Линча, несомненно требует углубленного исследования материала, что и демонстрирует представляемый нами случай.

Клинический случай

В начале 2020 г. пациентка П., 1981 г.р., обнаружила образование в молочной железе, в связи с чем обратилась в одну из клиник г. Оренбурга. Результаты выполненной маммографии и УЗИ свидетельствовали в пользу злокачественного характера новообразования левой молочной железы, и пациентка была направлена в ГБУЗ «Оренбургский областной клинический онкологический диспансер». В апреле 2020 г. пациентка осмотрена маммологом ГБУЗ «ОКОД». Маммография показала наличие в нижнем наружном квадранте левой молочной железы образования 29×25 мм, овоидной формы с нечеткими, неровными контурами, высокой интенсивности. По результатам УЗИ размер гипозоногенного образования левой молочной железы составил 34×26 мм. Выполнена трепанбиопсия образования. Гистологическое исследование выявило метапластический низкодифференцированный РМЖ неспецифического типа. В связи с недостаточным для ИГХ количеством материала в мае 2020 г. выполнена повторная биопсия: выявлен инвазивный низкодифференцированный РМЖ неспецифического типа, с выраженной лимфоидной инфильтрацией стромы. Согласно результатам иммуногистохимического исследования, данная опухоль является трижды негативным раком, при этом экспрессия Ki-67 составила 90%. У деда пациентки по матери в возрасте 83 лет был выявлен рак сигмовидной кишки, проведено оперативное лечение, после которого он прожил 11 лет без признаков рецидива и скончался по причинам, не связанным с опухолевым процессом. В остальном семейный онкологический анамнез отрицателен.

Принимая во внимание молодой возраст пациентки и трижды негативный фенотип опухоли, было принято решение начать неoadьювантную химиотерапию по схеме AC, выполнить молекулярно-генетическое исследование на предмет носительства мутаций в генах BRCA1 и BRCA2.

С мая 2020 г. на базе ЦОАП ГАУЗ «ГКБ им. Н.И. Пирогова» г. Оренбурга пациентке проведено 4 цикла химиотерапии. По результатам этого этапа лечения определялась разнонаправленная клиническая динамика — уменьшение первичного очага в левой молочной железе, сочетающееся с увеличением подмышечного лимфоузла. В лаборатории молекулярной онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова было выполнено таргетное секвенирование ДНК-панели, включившей полную кодирующую последовательность 58 генов наследственного рака. Пробоподготовка осуществлялась с использованием гибридационной панели HEAT-Seq Choice (Roche), исследование было выполнено на оборудовании MiSeq (Illumina, USA), средняя глу-



Феномен «потери гетерозиготности» за счет утраты мутантного аллеля с.631C>T (p.Arg211X) в гене *PMS2* в опухоли у пациентки П.

А — отклонение кривой высокоразрешающего плавления продуктов амплификации соответствующего фрагмента гена *PMS2* в случае образца ДНК, выделенной из крови пациентки, от аналогичных кривых контрольных образцов; отсутствие отклонения кривой в случае образца, выделенного из опухолевой ткани пациентки («потеря гетерозиготности»); Б — гетерозиготность аллеля с.631C>T (p.Arg211X) в образце ДНК, выделенной из крови пациентки (секвенирование по Сенгеру); потеря мутантного аллеля в образце ДНК, выделенной из опухоли пациентки

бина покрытия составила 200х. Неожиданной случайной находкой явилось выявление нон-сенс-мутации с.631C>T (p.Arg211X) в гене *PMS2* (транскрипт NM_000535, генетический вариант присутствует в базе данных dbSNP под номером rs760228510), потенциально ассоциированной с синдромом Линча. Так как это заболевание не связано с повышением чувствительности к препаратам платины, неоадьювантная терапия была продолжена в стандартном режиме и объеме: пациентка получила 12 циклов монотерапии таксанами. В ноябре больная поступила на торакальное отделение ГБУЗ «ООКОД» для обследования и проведения оперативного лечения. В декабре 2020 г. была выполнена радикальная резекция молочной железы слева, послеоперационный период протекал без осложнений, швы сняты, рана зажила первичным натяжением. По результатам гистологического исследования операционного материала наблюдался полный патологический ответ новообразования: опухолевые

клетки не выявлены, в т.ч. в восьми удаленных лимфоузлах и в краях резекции. В настоящее время пациентка проходит лучевую терапию, признаков рецидива не наблюдается.

В связи с идентификацией варианта, ассоциированного с синдромом Линча, пациентке были даны стандартные рекомендации: прохождение колоноскопии и ЭГДС, проведение УЗИ органов брюшной полости и органов малого таза один раз в 1–2 года, наблюдение онколога и онкогинеколога. Родственники пациентки получили рекомендацию пройти молекулярно-генетическое исследование. Для решения вопроса о тактике лечения на момент получения неоадьювантной терапии выполнено углубленное исследование опухолевого материала на предмет патогенетической связи опухоли с мутацией в *PMS2*. После проведения микродиссекции опухоли из биопсийного материала стандартным фенол-хлороформным способом была выделена ДНК. Методом фрагментного анализа на автоматическом

секвенаторе GenomeLab GeXP™ Genetic Analysis System (Beckman-Coulter, USA) выполнена оценка статуса микросателлитных маркеров BAT25, BAT26, BAT40, CAT25. Изменений длины этих последовательностей, которые свидетельствовали бы о феномене микросателлитной нестабильности, выявлено не было. Оставшегося гистологического материала было недостаточно для выполнения ИГХ, и было принято решение предпринять поиск соматических повреждений аллеля «дикого типа» в опухолевой ДНК. Результаты ПЦР с последующим высокоточным анализом кинетики плавления ПЦР-продуктов, а также секвенирования фрагмента гена PMS2, содержащего локус мутации с.631C>T, были несколько неожиданны: в опухолевой ДНК обнаружена делеция мутантного аллеля, хорошо выявляемого в ДНК, выделенной из крови пациентки. С целью окончательного исключения значимых дефектов BRCA1 был выполнен анализ на предмет внутригенных перестроек BRCA1 при помощи мультиплексной лигазно-зависимой амплификации зондов (MLPA, MRC-Holland, Netherlands, набор P002), не показавший наличия перестроек.

Обсуждение

В литературе имеется ряд сообщений о клинических случаях РМЖ у носительниц мутаций в генах синдрома Линча, подобных представленному нами, в некоторых из них наблюдалась потеря белковой экспрессии затронутого гена [16], в других, как и в данной работе, сохранение функции второго аллеля [17]. Есть даже наблюдение, касающееся синхронного билатерального РМЖ, развившегося у пожилой носительницы мутации в гене *MSH2*: при схожей морфологической картине, в одном образовании наблюдалась типичная микросателлитная нестабильность, а в другом — полное отсутствие функциональных нарушений со стороны системы репарации неспаренных оснований [18]. Некоторой особенностью настоящей работы явилось использование в дифференциально-диагностических целях молекулярно-генетического исследования на предмет соматической инактивации второго аллеля. Это дополнение представляется нам весьма существенным, позволяющим внести ясность в некоторых сомнительных ситуациях, обходясь без использования сложных и дорогостоящих способов оценки общей мутационной нагрузки опухолевого генома [14].

Заключение

Вопрос о причастности синдрома Линча к возникновению карцином молочной железы

остаётся предметом для дискуссий. Зачастую у носительниц патогенных мутаций в генах синдрома Линча РМЖ развивается вне всякой связи с этими наследственными вариантами. Для принятия клинически значимых решений в подобных ситуациях требуется дифференциальная диагностика между «Линч-ассоциированным» и «Линч-независимым» РМЖ. Для оценки функционального значения наследственных повреждений в таких случаях необходимо выполнять анализ микросателлитной нестабильности, а также оценку состояния аллеля «дикого типа» в опухолевом геноме.

Вклад авторов:

Васильев А.Е. — ведение пациентки, описание клинического случая;

Янус Г.А., Иевлева А.Г. — разработка концепции научной работы, составление черновика статьи;

Янус Г.А., Преображенская Е.В., Михетько А.А., Суспицын Е.Н. — поиск и анализ данных литературы (различные аспекты);

Соколова Т.Н. (Стрелкова), Соколенко А.П., Алексахина С.Н., Бизин И.В. — проведение и обработка результатов таргетного секвенирования;

Соколова Т.Н. (Стрелкова), Ни В.И., Горгуль Ю.А., Чуйнышова С.А., Лайдус Т.А. — проведение анализа статуса микросателлитов, проведение анализа на «потерю гетерозиготности»;

Иевлева А.Г., Имянитов Е.Н. — критический анализ работы и редактирование текста с внесением ценного интеллектуального содержания

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии в статье конфликта интересов.

Финансирование

Данная работа поддержана грантом РФФ 21-75-30015.

ЛИТЕРАТУРА

1. Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer // *Genet Med*. 2018;20(10):1167–1174. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.254>
2. Nikitin AG, Chudakova DA, Enikeev RF et al. Lynch Syndrome Germline Mutations in Breast Cancer: Next Generation Sequencing Case-Control Study of 1,263 Participants // *Front Oncol*. 2020;10):666. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00666>
3. Nguyen-Dumont T, Steen JA, Winship I et al. Mismatch repair gene pathogenic germline variants in a population-based cohort of breast cancer // *Fam Cancer*. 2020;19(3):197–202. <https://doi.org/10.1007/s10689-020-00164-7>

4. Wang X, Brzosowicz JP, Park JY. Response to Roberts et al. 2018: cohort ascertainment and methods of analysis impact the association between cancer and genetic predisposition — the tale of breast cancer risk and Lynch syndrome genes MSH6/PMS2. *Genet Med.* 2019 Sep;21(9):2156–2157. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0471-8>. Epub 2019 Feb 28
5. Win AK, Jenkins MA, Dowty JG et al. Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(3):404–412. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-16-0693>
6. Ten Broeke SW, van der Klift HM, Tops CMJ et al. Cancer Risks for PMS2-Associated Lynch Syndrome // *J Clin Oncol.* 2018;36(29):2961–2968. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.4777>
7. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis // *Nature.* 1993;363(6429):558–561. <https://doi.org/10.1038/363558a0>
8. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis // *Dis Markers.* 2004;20(4–5):251–257. <https://doi.org/10.1155/2004/159347>
9. Ten Broeke SW, van Bavel TC, Jansen AML et al. Molecular Background of Colorectal Tumors From Patients With Lynch Syndrome Associated With Germline Variants in PMS2 // *Gastroenterology.* 2018;155(3):844–851. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.05.020>
10. Loughrey MB, McGrath J, Coleman HG et al. Identifying mismatch repair-deficient colon cancer: near-perfect concordance between immunohistochemistry and microsatellite instability testing in a large, population-based series // *Histopathology.* 2020. <https://doi.org/10.1111/his.14233>
11. Walsh MD, Buchanan DD, Cummings MC et al. Lynch syndrome-associated breast cancers: clinicopathologic characteristics of a case series from the colon cancer family registry // *Clin Cancer Res.* 2010;16(7):2214–2224. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-3058>
12. Lotsari JE, Gylling A, Abdel-Rahman WM et al. Breast carcinoma and Lynch syndrome: molecular analysis of tumors arising in mutation carriers, non-carriers, and sporadic cases // *Breast Cancer Res.* 2012;14(3):R90. <https://doi.org/10.1186/bcr3205>
13. Porkka NK, Olkinuora A, Kuopio T et al. Does breast carcinoma belong to the Lynch syndrome tumor spectrum? — Somatic mutational profiles vs. ovarian and colorectal carcinomas // *Oncotarget.* 2020;11(14):1244–1256. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27538>
14. Luchini C, Bibeau F, Ligtenberg MJL et al. ESMO recommendations on microsatellite instability testing for immunotherapy in cancer, and its relationship with PD-1/PD-L1 expression and tumour mutational burden: a systematic review-based approach // *Ann Oncol.* 2019;30(8):1232–1243. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz116>
15. Wen YH, Brogi E, Zeng Z et al. DNA mismatch repair deficiency in breast carcinoma: a pilot study of triple-negative and non-triple-negative tumors // *Am J Surg Pathol.* 2012;36(11):1700–1708. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182627787>
16. Beggs AD, Kousparos G, Hodgson SV. Loss of mismatch repair protein expression in breast carcinoma in patients with Lynch Syndrome: report of two cases // *Breast J.* 2013;19(2):193–195. <https://doi.org/10.1111/tbj.12077>
17. Sorscher S. The Importance of Distinguishing Sporadic Cancers from Those Related to Cancer Predisposing Germline Mutations // *Oncologist.* 2018;23(11):1266–1268. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0681>
18. D'Arcy C, Wen YH, Stadler ZK, Brogi E, Shia J. Synchronous breast cancers with different morphologic and molecular phenotypes occurring in Lynch syndrome: what does the heterogeneity imply? // *Am J Surg Pathol.* 2011;35(11):1743–1748. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182320c0f>

Поступила в редакцию 02.03.2021 г.

*A.E. Vasiliev¹, G.A. Yanus^{2,3}, E.N. Suspitsin^{2,3},
A.G. Iyevleva^{2,3}, T.N. Sokolova³, I.V. Bizin³,
A.P. Sokolenko^{2,3}, E.V. Preobrazhenskaya^{2,3},
V.I. Ni³, T.A. Laidus³, S.A. Chuinyshena^{2,3},
Yu.A. Gorgul², S.N. Aleksakhina³, A.A. Mikhetko³,
E.N. Imyanitov^{2,3,4}*

A case of breast cancer in PMS2 mutation carrier

¹ Orenburg Regional Clinical Oncology Center, Orenburg

² Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg,

³ N.N. Petrov National Medical Research Centre of Oncology, Saint Petersburg,

⁴ I.I. Mechnikov North-Western Medical University, Saint Petersburg

Breast cancer (BC) is not a typical manifestation of Lynch syndrome. The existence and extent of excessive breast cancer risk in carriers of pathogenic mutations in the Lynch syndrome-associated genes (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) remains an open question. In addition, it is known that some of the breast neoplasms in patients with this syndrome are causally linked to the hereditary mutation, and some arise completely independently of the hereditary defect in the gene of the DNA mismatch repair system. In the case of accidental detection of such germline mutations in breast cancer patients, a thorough differential diagnosis between these categories of tumors is required, and the result of it is actionable, requiring changes in the management. This is a report of a case of breast cancer that arose in a carrier of a pathogenic mutation in the PMS2 gene, which was an accidental finding. The description of molecular genetic diagnostics is given: the microsatellite markers assessment and the detection of «loss of heterozygosity» allowed to classify the neoplasm in a category of cases that developed without any causal link to the patient's Lynch syndrome.

Key words: adenocarcinoma, breast cancer, microsatellite instability, «loss of heterozygosity», PMS2, Lynch syndrome, DNA base repair system