

А. Ю. Колесник, Е. Г. Шайхаев, Г. П. Снигирева, В. Д. Чхиквадзе

Молекулярно-биологические свойства отечно-инфильтративной формы рака молочной железы

ФГБУ Российский научный центр рентгенорадиологии, Москва

Проведено изучение отечно-инфильтративного рака молочной железы в сравнении с другими формами местно-распространенного рака молочной железы по различным молекулярно-биологическим параметрам. Дана оценка экспрессии рецепторов стероидных гормонов, мутационного статуса гена HER2/neu, мутационного статуса гена ALK (количество копий гена, транслокация EML4-ALK, точковые мутации в 22-25 экзонах). Изучены мутационные изменения генов сигнального пути PIK3-AKT-mTOR (точковые мутации в 9 и 20 экзонах гена PIK3CA и 4 в экзоне гена AKT), мутации в экзонах 5-8 гена p53. В результате установлено, что при отечном раке молочной железы значительно чаще встречаются опухоли с отрицательным рецепторным статусом ($p=0,006$) и положительным HER2/neu статусом ($p<0,001$). У 5% больных отечно-инфильтративным раком молочной железы была выявлена транслокация EML4-ALK ($p=0,045$), при этом не выявлено ни одного случая амплификации гена ALK. При анализе гена PIK3CA обнаружено, что значительно чаще мутации локализовались в 9 экзоне ($p=0,038$). Не выявлено статистически значимых различий в количестве точковых мутаций гена p53 между группой отечно-инфильтративного рака молочной железы и контрольной группой.

Ключевые слова: рак молочной железы, отечно-инфильтративный, молекулярные маркеры

Отечно-инфильтративный рак молочной железы (ОИРМЖ) является редкой (1-5% случаев) инвазивной формой рака молочной железы (РМЖ), характеризующейся специфичной картиной местной распространенности процесса (отек, покраснение кожи молочной железы и увеличение ее в размерах) и агрессивностью клинического течения заболевания. Даже при условии применения комплексного подхода к

лечению общая 5-летняя выживаемость не превышает 40% [13].

Неутешительные результаты комплексного лечения ОИРМЖ, возможно, связаны с недостаточно изученными своеобразными молекулярно-биологическими характеристиками опухоли, которые могут определять особенности лечебной тактики. Проблема улучшения результатов лечения больных ОИРМЖ диктует необходимость изучения молекулярно-генетических особенностей данного заболевания с целью разработки новых терапевтических подходов [3,19].

На сегодняшний день проведено немало исследований, посвященных поиску молекулярно-биологических маркеров, определяющих фенотип ОИРМЖ. Например, это исследование, касающееся оценки HER2 статуса опухоли, экспрессии рецепторов EGFR, белка E-кадгерина, белка Rho C GTPase и белка p53 [4,5,6,7]. Несмотря на значимость данных исследований, общепринятый спектр маркеров, определяющий патогенез опухолевого процесса при ОИРМЖ, так и не определен.

Для определения возможных специфических маркеров ОИРМЖ нами были проанализированы следующие молекулярно-биологические параметры: экспрессия рецепторов стероидных гормонов, мутационный статус гена HER2/neu, признаки активации гена ALK (количество копий гена, транслокация EML4-ALK, точковые мутации в 22-25 экзонах), признаки активации сигнального пути PIK3-AKT-mTOR (точковые мутации в 9 и 20 экзонах гена PIK3CA и 4 в экзоне гена AKT), мутации в 5-8 экзонах гена p53.

Материалы и методы

Исследование основано на анализе образцов опухолевой ткани больных местно-распространенной формой РМЖ (IIA, IIB, IIIA, IIIB/IIIC), которые находились на лечении в ФГБУ РНЦРР с 2002 по 2013 год. Все больные были разделены на 2 группы. В основную группу исследования включены больные с ОИРМЖ (T4dN1-3M0), а в контрольную группу больные раком молочной железы

без признаков отека кожи (T2-3,4bN1-3M0). Для исследования экспрессии рецепторов стероидных гормонов, а также мутационного статуса генов HER2/neu и ALK с помощью FISH-метода, было отобрано 40 образцов опухолевой ткани больных ОИРМЖ и 80 образцов опухолевой ткани местно-распространенного РМЖ без отека кожи. Для исследования соматических точковых мутаций генов PIK3CA, ATK1, p53, ALK было отобрано по 37 образцов опухолевой ткани из каждой группы (табл. 1).

По возрастным характеристикам, репродуктивному статусу и методам проведенного лечения больные в группах не имели существенных отличий. Средний возраст больных в основной группе составил 52±11,9 года, а в контрольной 54±9,9 года. Менструальная функция была сохранена у 45% больных в основной группе и у 42,5% в контрольной группе.

Анализ экспрессии рецепторов стероидных гормонов методом иммуногистохимии

Для оценки экспрессии рецепторов стероидных гормонов использовались антитела к рецепторам эстрогена (PA0151, клон 6F11, Leica Microsystems), прогестерона

(PA0312, клон 16, Leica Microsystems). Результаты иммуногистохимического исследования оценивали полуколичественным способом по рекомендациям D. Allred et al в % и в баллах (максимум 8) [50]. Результат ≥1% (≥ 3х баллов) считался положительным [1].

Молекулярно-генетический анализ (FISH метод) мутационного статуса генов HER2/neu и ALK

Определение амплификации гена HER2/neu в гистологических образцах опухолей проводили с помощью набора ДНК-зондов Path Vysis HER-2 DNA ProbeKit фирмы «Abbott Molecular» (США) согласно методике, предложенной производителем. Для оценки результатов анализа применяли критерии, рекомендованные ASCO в 2013 г. [20].

Определение мутационного статуса гена ALK (количество копий гена, транслокация EML4-ALK) в гистологических образцах опухолей проводили с помощью набора ДНК-зондов Vysis ALK Break Apart FISH ProbeKit фирмы «Abbott Molecular» (США), согласно протоколу производителя. Для оценки результатов анализа применяли критерии, которые были предложены группой экспертов Европейского общества патологов (ESP) в 2012 г [16].

Таблица 1.

Результаты молекулярно-генетических исследований образцов опухолевой ткани в группах сравнения

1. Иммуногистохимический метод			
2. Гормональный статус опухоли	3. ОИРМЖ n=40 4. n(%)	5. Контроль n=80 6. n (%)	7. p
8. Положительный			
9. РЭ+/РП+	10. 19(47,5%)	11. 51 (63,75%)	12. 0,1
13. РЭ+/РП-	14. 3(7,7%)	15. 8 (10%)	16. 0,9
17. РЭ-/РП+	18. 1(2,5%)	19. 7 (8,75%)	20. 0,2
21. Отрицательный			
25. РЭ-/РП-	22. 17(42,5%)	23. 14 (17,5%)	24. 0,006
26. FISH метод			
27. Ген	28. ОРМЖn=40 29. n(%)	30. Контрольn=80 31. n(%)	32. p
33. HER2/neu (Амплификация)	34. 22 (55%)	35. 14 (17,5%)	36. <0,001
37. ALK 38. (Транслокация)	39. 2 (5%)	40. 0	41. 0,045
42. ALK 43. (Амплификация)	44. 0	45. 0	46. -
47. Секвенирование методом Сэнгера			
48. Ген	49. ОРМЖn=37 50. n (%)	51. Контрольn=37 52. n (%)	53. p
54. ALK 55. (мутации в экзонах 22-25)	56. 0	57. 0	58. -
59. p53 60. (мутации в экзонах 5-8)	61. 7(18,9%)	62. 8(21,6%)	63. 0,774
64. PIK3CA 65. (мутации в экзонах 9, 20)	66. 8 (21%)	67. 10 (27%)	68. 0,591
69. PIK3CA 70. (мутации в экзоне 9)	71. 5 (13%)	72. 1 (2,7%)	73. 0,038
74. PIK3CA 75. (мутации в экзоне 20)	76. 3 (8%)	77. 9 (24,3%)	78. 0,023
79. АКТ1 80. (мутации в экзоне 4)	81. 0	82. 2 (5,4%)	83. 0,154

Анализ соматических мутаций генов PIK3CA, ATK1, p53, ALK, с помощью секвенирования методом Сенгера

ДНК выделяли из образцов опухолевой ткани, предварительно депарафинизированных с помощью ксилола и спирта. Депротенинизацию проводили с помощью протеиназы К (Helicon, Россия). Для дальнейшего выделения ДНК использовали набор DNA Clean&Concentrator™ -5 (Epigenetics, USA).

Для выявления точковых мутаций в генах PIK3CA, ATK1, p53, ALK нами были разработаны праймеры для амплификации и последующего двустороннего секвенирования методом Сенгера соответствующих экзонов данных генов.

Для проведения ПЦР-амплификации использовали набор реагентов «GenPak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген». Программа амплификации включала в себя следующие стадии: 1) предварительная денатурация при 95°C – 1 мин, 2) 45 циклов: денатурация 95°C 20 сек, отжиг 58°C 20 сек, синтез 74°C 30 сек, 3) заключительный синтез при 74°C 2 мин.

Очистку и секвенирование ПЦР-продуктов методом Сенгера проводили в компании ООО «Синтол», используя те же варианты праймеров, что и для амплификации.

Анализ и статистическая обработка данных в ходе исследования проводилась при помощи пакета программ, «IBM SPSS Statistics 20» (USA), «StatSoft STATISTICA 6. 0» Для сравнения различий значений в группах по тому или иному признаку нами использованы критерий χ^2 (сравнение категориальных бинарных переменных) и t-критерий Стьюдента (сравнение средних величин). Различия результатов считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Статус стероидных гормонов и анализ амплификации гена HER2/neu

К настоящему времени имеется немало данных, касающихся рецепторного и HER2 статуса ОИРМЖ. Установлено, что в большинстве случаев ОИРМЖ имеет отрицательный статус по рецепторам эстрогенов и прогестерона (от 55 до 83 % случаев) и положительный статус по амплификации гена HER2/neu (до 50% случаев) [4, 8].

В результате нашего исследования в группе ОИРМЖ преобладали случаи с отрицательным рецепторным статусом. При изучении HER2/neu статуса опухолей установлено, что при ОИРМЖ значительно чаще, чем при других формах местно-распространенного РМЖ, встречаются опухоли с положительным HER2/neu статусом (табл. 1).

Отсутствие экспрессии рецепторов стероидных гормонов связано с более агрессивным клиническим течением и со снижением выживаемости больных. Так, медиана выживаемости среди женщин с положительным статусом стероидных гормонов составляет 4 года против 2х лет с негативным статусом [13]. Гиперэкспрессия HER2/neu при неотечных формах рака молочной железы, как правило, связана

с плохим прогнозом. Истинное значение гиперэкспрессии HER2 среди больных ОИРМЖ в настоящее время неизвестно. Анализ результатов лечения более 2000 женщин с ОИРМЖ, зарегистрированных в Калифорнийском раковом регистре, показал более высокую выживаемость больных с HER2-позитивными опухолями по сравнению с HER2-негативными опухолями [12]. Вполне вероятно, что более благоприятный прогноз в случае гиперэкспрессии HER2/neu связан с применением таргетных препаратов [17].

Анализ мутационного статуса гена ALK

В настоящее время активно изучается значение гена ALK при ОИРМЖ. По одним данным, активирующие мутации в гене ALK (точковые мутации, амплификации, транслокации, анеусомии) являются общей чертой ОИРМЖ, другие данные свидетельствуют о редкой частоте встречаемости данных событий [10, 14, 17]. В нашем исследовании были выявлены транслокации EML4-ALK в двух образцах из группы ОИРМЖ и ни одного случая в контрольной группе. Что касается мутационных событий, приводящих к изменению числа копий гена ALK (амплификации, анеусомии) в клетке, то нам не удалось выявить ни одного такого случая ни в контрольной группе, ни в группе ОИРМЖ, что не соответствует многим известным данным о высокой частоте этих мутаций при ОИРМЖ. Также не были обнаружены активирующие точковые мутации в киназном домене гена ALK (табл. 1).

Анализ мутационного статуса генов PIK3CA, AKT1

Активация АКТ-каскада является частым механизмом онкогенеза при большинстве злокачественных заболеваний, включая РМЖ, и ассоциирована с изначальной или приобретенной резистентностью к антиэстрогенам и ингибиторам рецепторных тирозиназ, а также с потенциальной чувствительностью к ингибиторам mTOR. Основными путями активации АКТ-каскада являются активирующие мутации в генах PIK3CA и AKT1 [15].

Анализ 9 и 20 экзонов гена PIK3CA, проведенный в настоящем исследовании, не показал достоверно значимых различий по частоте мутаций между группой ОИРМЖ и контрольной группой. Однако, были получены достоверные различия в количестве мутаций, локализованных в разных экзонах гена PIK3CA. В группе ОИРМЖ больший процент мутаций обнаружен в 9 экзоне, в то время как для контрольной группы более характерны мутации в 20 экзоне. Поиск мутаций в гене AKT1, который произво-

дился в 4 экзоне, достоверных различий в количестве мутаций между двумя обследуемыми группами не выявил (табл. 1).

Прогностическое значение мутации в гене PIK3CA при РМЖ до конца не определено. S Li и его коллеги установили, что мутации в гене PIK3CA связаны с плохим прогнозом [11]. К. Kalinsky по результатам своих исследований предположил, что мутации в гене PIK3CA связаны с улучшением общей выживаемости больных РМЖ [9]. М. Barbareschi и его коллеги сообщили, что мутации в 9 экзоне гена PIK3CA связаны с ранним прогрессированием заболевания и снижением выживаемости больных, а мутации в 20 экзоне гена ассоциированы с благоприятным прогнозом [2]. Результаты, полученные в нашем исследовании, близки к данным М. Barbareschi et al. Результаты поиска мутаций в гене PIK3CA определенно имеют значение для расширения показаний к молекулярно-направленной терапии не только у больных ОИРМЖ, но и у больных с местно-распространенной формой РМЖ без признаков отека.

Анализ мутационного статуса генар53

Опухоли с высокой ядерной экспрессией мутантного белка p53 характеризуются высоким уровнем метастазирования, резистентностью к антрациклинам и плохим прогнозом. Повышенный уровень ядерной экспрессии p53 был детектирован и в образцах опухолевой ткани ОИРМЖ по сравнению с другими местно-распространенными формами РМЖ. Существует корреляция между наличием точковых мутаций в экзонах 5-8 гена p53 и повышенной экспрессией белка p53 в ядре. Важным свойством мутантного белка p53 по сравнению с нормальным, является его более продолжительное время полужизни и, как следствие, повышенное накопление в ядре [7].

Анализ 5-8 экзонов, кодирующих ДНК-связывающий сайт гена p53, не выявил статистически значимых различий в количестве точковых мутаций между двумя исследуемыми группами (табл. 1).

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования показано, что при ОИРМЖ отрицательный статус рецепторов стероидных гормонов, положительный HER2/neu статус, транслокация EML4-ALK и мутация в 9 экзоне гена PIK3CA встречаются чаще по сравнению с другими формами местно-распространенного РМЖ.

Полученные данные при использовании их в клинической практике позволят персо-

нифицировать лечение больных ОИРМЖ посредством расширения показаний к применению таргетных препаратов, таких как ингибиторы тирозинкиназ и mTOR.

С другой стороны, нами не были обнаружены характерные признаки ОИРМЖ, описанные другими авторами, такие как высокая частота амплификаций гена ALK, а также высокая частота мутаций в гене p53. В связи с этим молекулярно-биологические свойства ОИРМЖ требуют дальнейшего детального изучения (например, привлечения высокопроизводительных методов молекулярно-генетического анализа, а также увеличения объемов исследуемых выборок), что позволит приблизиться к пониманию как патогенеза заболевания, так и к обнаружению новых терапевтических мишеней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allred D., Harvey J., Berardo M. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis // *Mod. Pathol.* - 1998. - Vol. 11 (2). - P. 155-168.
2. Barbareschi M., Buttitta F., Felicioni L. et al. Different prognostic roles of mutations in the helical and kinase domains of the PIK3CA gene in breast carcinomas // *Clin. Cancer Res.* - 2007. - Vol. 13. (20). - P. 6064-6069.
3. Bertucci F., Finetti P., Birnbaum D. et al. Gene Expression Profiling of Inflammatory Breast Cancer // *Cancer Res.* - 2010. - Vol. 116 (11). - P. 2783-2793.
4. Dirix L., Vermeulen P. Inflammatory HER2-positive breast cancer // *Lancet Oncology.* - 2012. - Vol. 13 (4). - P. 324-326.
5. Dong H., Liu G., Hou Y. et al. Dominant-negative E-cadherin inhibits the invasiveness of inflammatory breast cancer cells in vitro // *J. Cancer Res Clin. Oncol.* - 2007. - Vol. 133 (2). - P. 83-92.
6. Golen K., Wu Z., Qiao X. et al. RhoGTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype // *Cancer Res.* - 2000. - Vol. 60 (20). - P. 5832-5838.
7. Gonzalez-Angulo A., Sneige N., Buzdar A. et al. p53 expression as a prognostic marker in inflammatory breast cancer // *Clin. Cancer Res.* - 2004. - Vol. 10 (18). - P. 6215-6221.
8. Harvey H., Lipton A., Lawrence B. et al. Estrogen receptor status in inflammatory breast carcinoma // *J. Surg. Oncol.* - 1982. - Vol. 21 (1). - P. 42-44.
9. Kalinsky K., Jacks L., Heguy A. et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer // *Clin. Cancer Res.* - 2009. - Vol. 15. - № 16. - P. 5049-5059.
10. Lerebours F., Callens C., Vacher S. Rare overexpression of anaplastic lymphoma kinase gene in inflammatory and non-inflammatory breast cancer // *European Journal of Cancer.* - 2013. - Vol. 49. - № 12. - P. 2774-2776.
11. Li S., Rong M., Grieu F. et al. PIK3CA mutations in breast cancer are associated with poor outcome // *Breast Cancer Res Treat.* - 2006. - Vol. 96. - № 1. - P. 91-95.
12. Rehman S., Reddy C.A., Tendulkar R.D. Modern Outcomes of Inflammatory Breast Cancer: The Cleveland

- Clinic Experience // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* – 2011. – Vol. 81. – № 2. – P. 619-624
13. Robertson F.M., Bondy M., Yang W. et al. Inflammatory breast cancer: the disease, the biology, the treatment // *CA Cancer J. Clin.* – 2010. – Vol. 60 (6). – P. 351-375.
 14. Robertson F.M., Petricoin Iii E.F., Van Laere S.J. et al. Presence of anaplastic lymphoma kinase in inflammatory breast cancer // *Springer Plus.* 2013;2:497. doi:10.1186/2193-1801-2-497.
 15. Samuels Y., Diaz L., Schmidt-Kittler O. et al. Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells // *Cancer Cell.* – 2005. – Vol. 7. - № 6. – P. 561-573.
 16. Thunnissen E., Bubbendorf L., Dietel M. et al. EML4-ALK testing in non-small cell carcinomas of the lung: a review with recommendations // *Virchows Arch.* – 2012.- Vol. 461. - № 3. – P. 245-257.
 17. Tsai C., Li J., Gonzalez-Angulo A. et al. Outcomes After Multidisciplinary Treatment of Inflammatory Breast Cancer in the Era of Neoadjuvant HER2-directed Therapy // *Am. J. Clin. Oncol.* – 2015. - Vol. 12. - № 17. – P. 223-235.
 18. Tuma R. ALK gene amplified in most inflammatory breast cancers // *J Natl Cancer Inst.* – 2012. – Vol. 104 (2). – P. 87-88.
 19. Yamauchi H., Woodward W.A., Valero V. et al. Inflammatory breast cancer: what we know and what we need to learn // *Oncology.* – 2012. – Vol. 17 (7). – P. 891-899.
 20. Wolff A., Hammond E., Hicks D. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer// *Arch Pathol Lab Med.* – 2013. - Vol. 31. - № 31. –P. 3997-4013.

Поступила в редакцию 30. 03. 2016 г.

*A. Yu. Kolesnik, E. G. Shaikhaev, G. P. Snegireva,
V. D. Chkhikvadze*

Molecular-biological properties of edematous-infiltrative form of breast cancer

Russian Research Center of Rentgenoradiology
Moscow

There was conducted a study of edematous-infiltrative form of breast cancer in comparison with other forms of locally advanced breast cancer in various molecular-biological parameters. It was provided an evaluation of expression of receptors of steroid hormones, mutational status of HER2/neu gene, mutation status of ALK gene (a number of copies of a gene, translocation of EML4-ALK, point mutations in exons 22-25). There were studied mutational changes of genes of signaling pathway PIK3-AKT-mTOR (point mutations in exons 9 and 20 of PIK3CA gene and 4 in exon of AKT gene), mutations in exons 5-8 of p53 gene. It was found that in edematous breast cancer significantly more frequently there were met tumors with negative receptor status ($p = 0.006$) and a positive HER2/neu status ($p < 0,001$). In 5% of patients with edematous-infiltrative breast cancer there was detected translocation of EML4-ALK ($p = 0.045$), while it was not found a single case of ALK gene amplification. In the analysis of PIK3CA gene it was revealed that significantly frequently mutations localized in exon 9 ($p = 0.038$). There were no statistically substantial differences in the number of point mutations of p53 gene between a group of edematous-infiltrative breast cancer and a control group.

Key words: breast cancer, edematous-infiltrative, molecular markers