

На правах рукописи

ЛУГОВАЯ Ольга Владимировна

**ИЗУЧЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ФАКТОРОВ
НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ И ИХ РЕЦЕПТОРОВ С ФОРМИРОВАНИЕМ
РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

03.02.07 - генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Белгород – 2012

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» Минобрнауки РФ

Научный руководитель: Должиков Александр Анатольевич
доктор медицинских наук, профессор

Официальные оппоненты:

Иванов Владимир Петрович

заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, зав.каф. биологии, медицинской генетики и экологии

Голубцов Виктор Иванович

доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, зав. каф. биологии с курсом медицинской генетики

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ

Защита диссертации состоится «22» ноября 2012 года в «14.00» часов на заседании совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук Д 212.015.13 при ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» по адресу: 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Автореферат разослан «12» октября 2012 г.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций на соискание
учёной степени кандидата наук, на соискание
учёной степени доктора наук,
доктор биологических наук

В.И. Кочкаров

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Рак молочной железы (РМЖ) неизменно занимает первое место в структуре онкологической заболеваемости женщин в экономически развитых странах. В 2009 г. в России зарегистрировано 54315 новых случаев рака молочной железы, что составляет 20,1% общей онкозаболеваемости. По сравнению с 2004 г. прирост составил 10,3%, средний показатель заболеваемости - 44,2 на 100 тысяч женского населения [Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2011].

В настоящее время серьезной проблемой в клинической онкологии при планировании терапии РМЖ является значительная вариабельность чувствительности опухолей к лечебным мероприятиям в связи с выраженной их морфологической, иммунологической и генетической гетерогенностью. К числу биологически значимых тканевых маркеров рака молочной железы относятся рецепторы стероидных гормонов: эстрогенов и прогестерона, а также рецепторы эпидермального фактора роста II типа (белок Her2/neu). Гормонозависимые опухоли молочной железы, содержащие оба, или хотя бы один из рецепторов, имеют более благоприятное течение и оказываются чувствительными к гормонотерапии [Моисеенко В.М., и др., 1997; Кушлинский Н.Е., Герштейн Е.С., 2001; Семиглазов В.Ф. и др., 2001]. Гиперэкспрессия Her2/neu, связанная с амплификацией соответствующих генов, ассоциируется с увеличением темпов ее роста и метастазированием, а также неблагоприятно влияет на показатели безрецидивной и общей выживаемости [Hortobagyi G.N., 1999; Piccart M.J., 1999; Семиглазов В.Ф., 2000].

Многочисленные исследования с применением достижений молекулярной биологии выявили связи между экспрессией различных групп генов, особенностями клинического течения РМЖ и его чувствительности к различным видам терапии [Silvestrini R., Benini E., et al., 1993; Wooster R., et al., 1995; Ciardiello F., 2001; Любченко Л.Н. и др., 2004]. По данным литературы полиморфизмы таких цитокинов как фактор некроза опухолей α (TNF α) и лимфотоксин α (L α) оказывают влияние на развитие и течение злокачественных опухолей молочной железы. Однако результаты разных исследователей противоречивы и окончательно роль TNF α в канцерогенезе РМЖ до конца не изучена. Исследования, посвящённые изучению данных молекулярно-генетических аспектов РМЖ, в России немногочисленны [Маливанова Т. Ф., Осташкин А. С., 2007]. Изучения требуют ассоциации полиморфных маркеров генов семейства факторов некроза опухолей и их рецепторов с семейно-наследственными факторами, клиническими, иммунофенотипическими особенностями опухолей и эндокринно-метаболическими факторами риска.

Цель исследования: изучить вовлеченность генетических полиморфизмов факторов некроза опухолей в формирование, клинические и иммунофенотипические особенности рака молочной железы.

Задачи исследования:

1. Изучить распространенность полиморфных вариантов генов фактора некроза опухолей α (-308G/A *TNF α*), лимфотоксина α (+250A/G *Lt α*), рецепторов фактора некроза опухолей 1-го (+36A/G *TNFR1*) и 2-го (+1663A/G *TNFR2*) типов у больных раком молочной железы и в популяционной выборке.
2. Изучить ассоциации молекулярно-генетических маркеров с возрастными, эндокринно-метаболическими и семейно-наследственными факторами при раке молочной железы.
3. Провести анализ ассоциаций молекулярно-генетических маркеров с характеристиками клинических стадий рака молочной железы.
4. Изучить иммунофенотипические особенности рака молочной железы и их связь с клиническими характеристиками опухолей.
5. Определить наличие и значение ассоциаций молекулярно-генетических маркеров с иммунофенотипическими особенностями рака молочной железы.

Научная новизна. Впервые проведен анализ ассоциаций полиморфных локусов факторов некроза опухолей (-308G/A *TNF α* , +250A/G *Lt α*) и их рецепторов (+36A/G *TNFR1*) и 2-го (+1663A/G *TNFR2*) с развитием рака молочной железы, эндокринно-метаболическими и семейно-наследственными факторами пациенток, клиническими и иммунофенотипическими особенностями опухолей. Установлены связи молекулярно-генетических маркеров с наличием эндокринно-метаболических факторов риска, гинекологическими заболеваниями при раке молочной железы, семейно-наследственной отягощенностью, клинической стадией и иммунофенотипом опухолей.

Научно-практическое значение. Выявленные в результате исследования ассоциации молекулярно-генетических маркеров с характеристиками пациенток с раком молочной железы и клинико-иммуноморфологическими особенностями опухолей могут быть использованы в работе онкологических клиник при определении прогноза течения рака молочной железы, оптимизации индивидуальных подходов к лечению. Полученные данные являются основой для дальнейших исследований роли генетических факторов в развитии рака молочной железы. Результаты исследования используются в образовательном процессе в ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», а также в практической работе в иммуногистохимической лаборатории ОГКУЗ особого типа «Белгородское патологоанатомическое бюро» и в практической работе ОГБУЗ «Белгородский онкологический диспансер».

Апробация работы. Основные результаты диссертации были представлены на: межвузовской научной конференции, посвященной памяти профессора В.В. Пичугина и 75-летию КГМУ (Курск 2009), Всероссийской конференции «Охрана репродуктивного здоровья - будущее России»

(Белгород, 2010), научно-практической конференции с международным участием «Современные аспекты патоморфологической диагностики, клиники и лечения рака молочной железы. Вопросы организации патологоанатомической службы» (Воронеж, 2010), Всероссийской конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии», посв. памяти чл.-корр РАМН, проф. В.Б. Писарева (Волгоград, 2010), Всероссийской конференции с международным участием «Репродуктология: новые технологии, перспективы» (Белгород, 2010), VI Съезде Российского общества медицинских генетиков (Ростов – на – Дону, 2010), международной конференции «Геронтологические чтения - 2010» (Белгород, 2010), II всероссийской научной конференции с международным участием, «Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии» (Курск, 2011).

Личный вклад автора. Автором лично определены цель и задачи исследования, разработаны методические подходы для их решения, проведено клиническое обследование всех больных РМЖ, выполнен сбор и анализ анамнестической информации. Автор лично принимал участие в выполнении молекулярно-генетических и иммуноморфологических исследований, проводил обработку и анализ полученных данных, подготовку **основных** публикаций, апробацию результатов исследования, написание и оформление рукописи.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 4 в журналах из перечня ВАК Минобрнауки РФ.

Положения, выносимые на защиту.

1. Генетические полиморфизмы $-308G/A$ $TNF\alpha$, $+250A/G$ Lta и $+1663 A/G$ $TNFR2$ ассоциированы с формированием рака молочной железы.

2. Молекулярно-генетические маркеры ассоциированы с семейно-наследственной онкологической отягощенностью анамнеза, эндокринно-метаболическими факторами риска.

3. Клиническая стадия заболевания на момент выявления опухоли связана с генами-кандидатами.

4. Имеются значимые ассоциации клинических, иммунофенотипических особенностей рака молочной железы и молекулярно-генетических маркеров.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы материала и методов исследования, главы результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследования, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Результаты исследования обобщены в 22 таблицах, представлены на 10 рисунках, включающих 8 графиков и диаграмм, 2 монтажа из 13 микрофотографий. Список литературы содержит 216 источников, из них 51 отечественный, 165 зарубежных.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, госконтракт № 02.740.11.0712.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клиническая характеристика исследованных групп

Исследование выполнено в двух группах: пациентки с РМЖ (основная) и группа популяционного контроля. Основная группа состояла из 250 случаев, в которых было выполнено молекулярно-генетическое исследование. Возраст пациенток составил от 25 до 77 лет (в среднем $57,4 \pm 11,0$). Группа сформирована соответственно критериям отбора: (русские, уроженки Центрального Черноземья, не имеющие родства между собой) из общего числа полностью исследованных случаев РМЖ, которые использованы для анализа иммуноморфологических особенностей опухолей и клинических сопоставлений. Все наблюдения представлены впервые выявленными карциномами молочной железы за период с 2007 по 2011 годы.

Группа популяционного контроля представлена 248 женщинами в возрасте от 20 до 60 лет (средний возраст $54,2 \pm 7,5$ лет), отобранных по национальному составу (русские) и месту рождения (уроженки Центрального Черноземья, не имеющие родства между собой). Обе исследуемые группы не отличались по возрасту ($p > 0,05$), месту рождения и национальности.

Клинико-лабораторное обследование пациенток проведено на базах поликлинического и хирургического отделений Белгородского областного онкологического диспансера. Морфологическое и иммуногистохимическое исследования выполнены на базах отделения онкоморфологии Белгородского областного патологоанатомического бюро и лаборатории научно-образовательного центра «Прикладной иммуноморфологии и цитогенетики» НИУ БелГУ. Молекулярно-генетические исследования выполнены в лаборатории "Молекулярной генетики человека" медицинского факультета Белгородского государственного национального исследовательского университета.

Все исследования проводили с информированного согласия пациенток на использование материалов лечебно-диагностических мероприятий, связанных с заболеванием, для научно-исследовательских целей и протоколировались по стандартам этического комитета Российской Федерации. На каждую пациентку была заполнена разработанная анкета-опросник, включающая возраст, место рождения, место жительства, семейный онкологический и акушерско-гинекологический анамнез, историю заболевания и лечения.

Проведен анализ структуры патогенетически значимой, связанной с нарушением метаболизма стероидных гормонов и липопротеидным обменом, сопутствующей патологии в группе больных РМЖ. У всех пациенток

исследуемой группы проводили определение веса и типа питания с использованием показателя индекса массы тела по Кетле (ИМТ).

Иммунорфологические методы

Во всех случаях было выполнено стандартное патогистологическое исследование с верификацией гистологического типа карцином молочной железы, определением степени гистологической злокачественности по общепринятой системе Blum и Richardson. В исследование включены случаи типичных инвазивных протоковых карцином. После патогистологического исследования выполнено иммуногистохимическое определение уровней экспрессии рецепторов эстрогенов (ER) и прогестерона (PgR), а также экспрессии рецепторов эпидермального фактора роста II типа – белка Her2/neu. Исследование выполнено по стандартным протоколам диагностических иммуногистохимических исследований с использованием антител категории «For in vitro diagnostic»: к рецепторам эстрогенов (клон SP1; CellMarque, USA), к рецепторам прогестерона (клон SP2; CellMarque, USA), к белку Her2/neu – поликлональные антитела (Dako). Постановку реакций при определении белка Her2/neu осуществляли на автостейнере Autostainer 480 (ThermoScientific, Великобритания). Оценку уровней экспрессии ER и PgR осуществляли по общепринятой диагностической шкале Allred. Экспрессию Her2/neu оценивали в соответствии с современными рекомендациями с определением гиперэкспрессии при яркой непрерывной мембранной окраске в более чем 30% опухолевых клеток. Для объективизации полученных иммунорфологических данных создавали базу электронных изображений с помощью системы сканирования и архивирования изображений «MiraxDesk», а также на микроскопе «Leica DM4000B», оснащенного цифровой видеосистемой регистрации и анализа изображений.

Молекулярно-генетические методы

У всех пациенток основной группы (250) и у индивидуумов популяционного контроля (248) выполнено типирование четырех молекулярно-генетических маркеров: диаллельные локусы генов TNF α (-308G/A TNF α), Lta (+250A/G Lta), рецептора фактора некроза опухоли 1-го типа (+36A/G TNFR1) и рецептора фактора некроза опухоли 2-го типа (+1663A/G TNFR2).

Материалом для исследования послужила венозная кровь в объеме 8-9 мл, взятая из локтевой вены пробанда. Забор венозной крови производили в пробирки с консервантом, содержащим 0,5М раствор ЭДТА (pH=8.0).

Выделение геномной ДНК из периферической крови осуществлялось методом фенольно-хлороформной экстракции [Mathew C.C., 1984].

Анализ всех локусов осуществлялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК на амплификаторе IQ5 (Bio-Rad) с использованием полимеразы *Thermus aquaticus*, производства фирмы «Силекс-М», олигонуклеотидных праймеров и зондов, синтезированных

фирмой «Синтол» с последующим анализом полиморфизмов методом дискриминации аллелей.

Генотипирование ДНК-маркеров выполняли методом дискриминации аллелей на основе TaqMan зондов с использованием программного обеспечения Standart Edition Version 2,0 (Bio-Rad).

Методы анализа и статистической обработки результатов

Расчет фенотипических и генных частот проводили стандартными методами [Животовский Л.А., 1983, Вейр Б., 1995].

Для сравнения частот аллелей и генотипов между различными группами использовали критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность. Вычисления производили в таблицах сопряженности 2x2 (при 95% CI).

Об ассоциации молекулярно-генетических маркеров с формированием РМЖ судили по величине отношения шансов (OR). При изучении взаимосвязей генетических полиморфизмов с количественными признаками сначала оценивали характер распределения исследуемых признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка [Реброва О.Ю., 2006]. Последующий статистический анализ проводили в соответствии с характером распределения исследуемых количественных признаков [Реброва О.Ю., 2006].

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере с использованием программных пакетов «STATISTICA for Windows 6.0» и «Microsoft Excel 2003».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ частот полиморфизмов генов TNF α , лимфотоксина и рецепторов TNF α 1 и 2 типов при раке молочной железы и в популяционном контроле

Изучение частот генотипов полиморфных маркеров генов показало, что для всех рассмотренных локусов в популяционной выборке и в группе больных РМЖ эмпирическое распределение генотипов соответствует теоретически ожидаемому при равновесии Харди-Вайнберга ($p > 0,05$). Уровень аллельного разнообразия по изученным локусам варьировал от $H_0 = 0,19$ (для локуса $-308 G/A TNF\alpha$) до $H_0 = 0,47$ (для локуса $+36 A/G TNFR1$) в популяционной выборке и от $H_0 = 0,17$ ($-308 G/A TNF\alpha$) до $H_0 = 0,50$ ($+36 A/G TNFR1$) среди больных раком молочной железы. При сравнительном анализе распределения частот аллелей и генотипов полиморфных маркеров $-308 G/A TNF\alpha$, $+250 A/G Lta$, $+36 A/G TNFR1$ и $+1663 A/G TNFR2$ больных РМЖ и в группе популяционного контроля достоверных статистических различий не выявлено.

Полученные результаты свидетельствуют, что полиморфизмы изучаемых генов не имеют этиологического значения в развитии рака

молочной железы, они могут играть определенную роль в патогенезе данного заболевания и характере его течения, изучению чего посвящена основная часть данного исследования.

Таблица 7

Распределение частот полиморфных маркеров генов факторов некроза опухолей и их рецепторов у больных РМЖ и в популяционном контроле

Полиморфизм	Аллели, генотипы	Контрольная группа (n=248)		Больные (n=250)		OR (95% CI), χ^2 , p
		n _i	%	n _i	%	
-308G/A TNF α	-308G	446	89,92	449	89,80	0,99(0,64-1,52) $\chi^2 = 0,01$; p=1,00;
	-308A	50	10,08	51	10,20	
	-308GG	200	80,65	203	81,20	1,04(0,65-1,66) $\chi^2=0,01$; p=0,97;
	-308GA	46	18,55	43	17,20	0,91(0,56-1,48) $\chi^2 = 0,08$; p=0,78;
	-308AA	2	0,80	4	1,60	2,00(0,31-15,86) $\chi^2=0,16$; p=0,69;
+250A/G Lta	+250A	370	74,90	372	74,40	0,97(0,73-1,31) $\chi^2=0,01$; p=0,92;
	+250G	124	25,10	128	25,60	
	+250AA	136	55,06	138	55,20	1,01(0,69-1,45) $\chi^2 = 0,01$; p=1,01;
	+250GA	98	39,67	96	38,40	0,95(0,65-1,38) $\chi^2 = 0,40$; p=0,84;
	+250GG	13	5,27	16	6,40	1,23(0,55-2,78) $\chi^2 = 0,12$; p=0,73
+36A/G TNFR1	+36A	245	49,80	253	51,01	1,05(0,8-1,36) $\chi^2 = 0,10$; p=0,75;
	+36G	247	50,20	243	48,99	
	+36AA	65	26,42	64	25,80	0,97(0,64-1,48) $\chi^2 = 0,003$; p=0,96;
	+36AG	115	46,75	125	50,40	1,16(0,8-1,67) $\chi^2 = 0,52$; p=0,47;
	+36GG	66	26,83	59	23,80	0,85(0,56-1,30) $\chi^2 = 0,45$; p=0,50;
+1663 A/G TNFR2	+1663A	179	37,29	204	40,96	0,86(0,66-1,11) $\chi^2 = 1,23$; p=0,27;
	+1663G	301	62,71	294	59,04	

	+1663AA	35	14,58	46	18,47	1,32(0,79-2,20) $\chi^2 = 0,72; p=0,30;$
	+1663AG	109	45,42	112	44,98	0,98(0,68-1,42) $\chi^2 = 0,0; p=0,90;$
	+1663GG	66	40,00	91	36,55	0,86(0,59-1,27) $\chi^2 = 0,86; p=0,49$

Анализ ассоциаций полиморфизмов генов TNF α , Lta и рецепторов TNF α 1 и 2 типов с возрастными, соматическими и семейно-наследственными факторами при раке молочной железы

В зависимости от возраста пациентки были разделены на две группы: до 50 лет (n=76) и старше 50 лет (n=174). При анализе полиморфизма генов факторов некроза опухолей и их рецепторов среди женщин с РМЖ в зависимости от возраста выявлены статистически достоверные различия. Обнаружено, что в группе до 50 лет выше концентрация аллеля -308G TNF α (94,08%) по сравнению с группой старше 50 лет (87,93%, $\chi^2 = 3,72$, p=0,05), а также гомозиготного генотипа -308GG TNF α , частота которого составила 88,46%, что почти на 10% выше чем в группе старше 50 лет.

У всех пациенток проведено определение индекса массы тела (ИМТ) на момент установления диагноза. Из 250 больных РМЖ нормальную и пониженную массу тела имели только 18% (n=45). У 205 женщин выявлен избыток масса тела и ожирение различной степени, в 16 случаях отмечалось морбидное ожирение с ИМТ более 40. При изучении распределения полиморфных генетических маркеров у женщин с раком молочной железы без ожирения и повышенной массой тела выявлено, что у пациенток с ИМТ более 25 для +36 A/G TNFR1 характерно увеличение частот генотипов +36AG и +36GG (около 6%) с недостоверной разницей.

Нарушения жирового обмена сопровождаются инсулинорезистентностью, способствуя тем самым возрастанию уровня инсулиноподобных факторов роста. Жировые отложения являются источником внегонадного синтеза половых стероидов, в том числе андрогенов, которые путем ароматизации преобразуются в эстрогены. Подобное состояние реализуется за счет эффектов эстрогенов и, в конечном итоге, может привести к гиперплазии ткани молочной железы и послужить фоном для развития неоплазии [Бештейн Л.М., 2009].

Одним из факторов риска развития новообразований в молочной железе могут являться заболевания гепатобилиарной системы (гепатит, жировой гепатоз, холестаз). Вследствие нарушения обменных процессов происходит замедленная утилизация эстрогенов из организма, одну из основных ролей в котором играет печень. При анализе ассоциаций полиморфизма изучаемых генов с патогенетически значимой обменно-эндокринной соматической патологией выявлено увеличение частоты генотипа -308 GA TNF α (21,20%) по сравнению с группой женщин без патологии (11,1%, $\chi^2 = 0,59$, p=0,05). Для локуса +1663AG TNFR2 отмечается

снижение **концентрации** до 38,0% в сравнении с группой без соматической патологии (56,12%, $\chi^2=6,74$, $p=0,01$).

Современный подход к рассмотрению причин возникновения РМЖ сместил акценты к поиску механизмов, связанных с наследственными факторами. Семейными формами (около 23%) считаются случаи рака молочной железы у одного или нескольких кровных родственников по материнской линии, генетически обусловленным (не более 9%) –случаи рака молочной железы у кровных родственников, а также ассоциированный рак (яичников, толстого кишечника) и связанный с мутацией генов BRCA1 и BRCA2 [Семиглазов В.В., 2009]. Большинство же случаев РМЖ представляет спорадический вариант у женщин, в семье у которых не было случаев онкологических заболеваний. Мы изучили особенности связей генетических полиморфизмов факторов некроза опухолей и их рецепторов с формированием РМЖ в зависимости от семейно-наследственной отягощенности.

В группу больных с отягощенным онкологическим анамнезом включены пациентки, у которых родственники 1-2 степени родства имели злокачественные опухоли различной локализации. У 39 женщин в семьях имели место случаи рака молочной железы и тела матки. При анализе полученных данных обнаружена наибольшая частота высокопродуктивного аллеля *-308A TNF α* 15,66% у пациенток со злокачественными новообразованиями в семье, по сравнению с группой женщин без онкологического анамнеза (7,49%, $\chi^2=7,23$, $p=0,008$), а так же высокопродуктивного генотипа *-308AA TNF α* (4,82%; $\chi^2=5,41$, $p=0,02$) и женщинами популяционного контроля (0,8%, $\chi^2=3,59$, $p=0,057$).

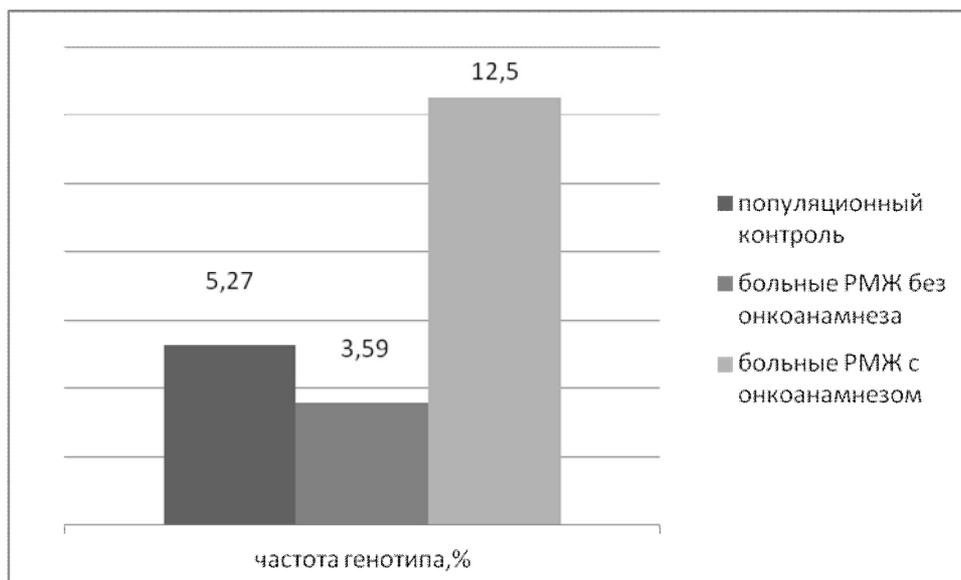


Рис.1. Распределение генотипа *+250 GG Lta* в группах больных РМЖ в зависимости от наличия или отсутствия онкопатологии в семье и популяционном контроле, %

Выявлено уменьшение концентрации аллеля +250A *Lta* в группе с наследственной отягощенностью на 10% (67,47%) в сравнении с группой контроля (74,94%; $\chi^2 = 3,11$, $p=0,07$) и группой без наследственной отягощенности (77,84%; $\chi^2 = 5,73$, $p=0,02$). При этом выявлено увеличение концентрации высокопродуктивного аллеля +250G *Lta* в первой группе больных (32,53%) в сравнении с женщинами без онкопатологии в семье (22,16%, $\chi^2 = 5,73$, $p=0,02$) и высокопродуктивного генотипа +250 GG *Lta* в 3 раза (12,5%) (рисунок 1).

Анализ ассоциаций полиморфизмов генов TNF α , лимфотоксина и рецепторов TNF α 1 и 2 типов с клиническими особенностями рака молочной железы

Группу высокого риска опухолевой патологии молочных желез представляют собой женщины с гиперпластическими процессами гениталий, нарушениями функций яичников. Различного рода воспалительные состояния влияют на частоту возникновения РМЖ. Изменения в сложной цепи гипоталамо-гипофизарно-яичниковой системы вызывают формирование широкого диапазона патологии молочных желез, которая в зависимости от характера гормональных нарушений проявляется в виде гипер- или гипопластических процессов.

У пациенток с сопутствующей гинекологической патологией (гиперпластические изменения эндометрия, нарушения функций яичников) нами выявлено достоверное преобладание генотипа +250AG *Lta*, что составило 42,86%, по сравнению с индивидуумами без сопутствующей гинекологической патологии (32,04%, $\chi^2 = 18,23$, $p=0,01$).

Одним из основных факторов прогноза при РМЖ является стадия опухолевого процесса на момент установления диагноза. При анализе генетических полиморфизмов с учетом стадии опухолевого процесса нами установлено следующее. Гетерозиготные генотипы -308GA *TNF α* при III стадии встречались в 26% случаев, тогда как при I стадии в 9,37% ($\chi^2 = 2,87$, $p=0,09$). Частота гомозиготного генотипа -308GG *TNF α* достоверно выше (90,63%) при первой стадии в сравнении с третьей (72,06%, $\chi^2 = 33,42$, $p=0,005$). Однако при III клинической стадии РМЖ в сравнении как с I ($\chi^2 = 7,61$, $p=0,006$), так и со II ($\chi^2 = 6,37$, $p=0,01$) выше концентрация аллеля +36A *TNF α* .

Поскольку в развитии РМЖ определяющее значение имеет гормональный фактор [Семиглазов В.В., 2009], безусловного внимания заслуживает анализ связи полиморфизмов изученных генотипов с другими изменениями дисгормональной природы, которые в разной степени могут быть фоновыми для РМЖ: в большей степени фибро-кистозные изменения с внутрипротоковой пролиферацией разной степени выраженности и атипии, в меньшей степени – фиброаденомы.

Из 250 больных РМЖ в 106 случаях диагностированы фибро-кистозные изменения, фиброаденома и внутрипротоковая папиллома

молочной железы, а в 6 случаях выявлены сочетания указанных патологий. Проведенный сравнительный анализ распределения генетических полиморфизмов факторов некроза опухолей и их рецепторов в группах больных РМЖ в зависимости от наличия доброкачественной патологии молочных желез показал, что пациентки больные РМЖ с доброкачественной патологией молочных желез имеют низкую встречаемость (более чем в 3 раза) генотипа +250 GG Lta лимфотоксина α (2,84%) по сравнению с больными без патологии молочных желез, с различиями близкими к достоверным.

Иммуноморфологические особенности рака молочной железы и их связь с клиническими характеристиками опухолей

Полученные в данной части работы результаты выявили наличие ряда закономерных связей между клиничко-морфологическими и иммунофенотипическими особенностями рака молочной железы, которые имеют значение для последующего анализа ассоциаций молекулярно-генетических маркеров с формированием РМЖ.

С возрастом достоверно увеличивается частота рецептор-позитивных случаев, как изолированно рецепторов эстрогенов, так и полного рецепторного позитива (ER+PgR+). При анализе по уровням экспрессии соответственно шкале Allred также выявлено преобладание высоких уровней экспрессии рецепторов стероидных гормонов, особенно ER. По декадам жизни установлено нарастание частоты ER+ карцином молочной железы от третьей декады (12,5%) до шестой (81,9%) с последующим некоторым снижением до стабильного уровня 64,2 – 72 % в возрастном интервале от 60 до 88 лет.

Другим важным маркером биологического потенциала РМЖ является наличие гиперэкспрессии рецепторов к эпидермальному фактору роста II типа – белка Her2/neu. При анализе собственного материала нами установлено, что частота гиперэкспрессии Her2/neu (Her2/neu 3+), являющейся фактором неблагоприятного прогноза, связана с экспрессией рецепторов эстрогенов, прогестерона, пролиферативной активностью и клиническими параметрами РМЖ. При полном рецепторном позитиве (ER+PgR+) частота гиперэкспрессии Her2/neu составляет 5,5%, тогда как при полном рецепторном негативе она достоверно ($p < 0,05$ по χ^2) в 4 раза выше.

Рецепторный статус связан с T стадией опухоли. При T₃ стадии достоверно ($p < 0,05$) больше частота ER- случаев, суммарно ниже частота рецептор-позитивных случаев при всех уровнях экспрессии (49,4% против 65,3% при T₁). Частота ER+PgR+ случаев прогрессивно уменьшается от T₁ до T₃ стадии, при этом в 2 раза увеличивается частота ER-PgR- статуса ($p < 0,05$).

Частота гиперэкспрессии Her2/neu при T₁ стадии составляет 7,1%, при T₃ – 15,7%. Нами обнаружено, что при T₁ стадии частота гиперэкспрессии Her2/neu связана с рецепторным статусом: Her2/neu 3+ случаи при сочетании T₁ ER+PgR+ составляют только 4,4%, тогда как при T₁ ER-PgR- частота

почти в 5 раз выше – 21,7% ($p < 0,05$ по χ^2). Гиперэкспрессия Her2/neu демонстрирует достоверную зависимость от N статуса и его сочетаний с уровнем стероидных рецепторов: при N₀ частота ее составляет 5,0%, при N₁ – 13,0%, при N₀ ER+PgR+ только 1,9%, при N₁ ER-PgR- 11,1%.

На основании иммунофенотипа в настоящее время определяются молекулярно-генетические подтипы рака молочной железы, которые отличаются по степени агрессивности течения, чувствительности к терапии и прогнозу. В изученном нами материале типы рака молочной железы распределились следующим образом: люминальный A – 62,4%, люминальный B – 4,6%, ТНРМЖ – 25,8%, Her2/neu 3+ – 7,2%. Основные иммуноморфологические картины представлены.

Анализ ассоциаций полиморфизмов генов TNF α , лимфотоксина и рецепторов TNF α 1 и 2 типов с иммунофенотипическими особенностями рака молочной железы

С учетом выявленных ассоциаций полиморфизмов изученных генов с основными факторами, имеющими значение в развитии и прогнозе РМЖ, а также иммунофенотипических особенностей изученных случаев опухолей нами проведен анализ связей молекулярно-генетических маркеров с иммунофенотипическими характеристиками в 250 случаях. Экспрессия рецепторов эстрогенов, прогестерона и Her2/neu являются определяющими биологическими характеристиками РМЖ не только для определения тактики лечения и прогноза, но и для определения биологических (молекулярно-генетических) подтипов, поскольку экспрессионный профиль опухолей во многом отражает основные генетические особенности опухолевых клеток.

В зависимости от иммунофенотипических вариантов РМЖ выявлено следующее.

Группа с люминальными типами карцином не имела отличий в частоте аллелей и генотипов обоих изученных цитокинов и рецепторов фактора некроза опухолей 1 и 2 типов. Наибольшее число отличий выявлено в группе Her-2/neu гиперэкспрессирующего РМЖ и при гиперэкспрессии данного белка вне зависимости от рецепторного статуса. Аллель A в гомозиготном (-308 AA TNF α) и гетерозиготном (-308 GA TNF α) вариантах имелся в 30,43%, в группе популяционного контроля – 19,35%, в группе ТНРМЖ – 12,50% ($p < 0,05$). При объединении всех случаев с гиперэкспрессией Her2/neu в одну группу (вне зависимости от рецепторного статуса) установлено, что при наличии высокопродуктивного аллеля A частота гиперэкспрессии Her2/neu почти в 2 раза выше (14,9%), чем при гомозиготном генотипе -308 GG TNF α , при котором она составляет 7,9% ($p < 0,05$).

Связи генотипов и Her-2/neu статуса выявлены и для Lta. Аллель +250 G Lta в группе ТНРМЖ выявлен в 30,4% случаев, что было выше, чем в популяционном контроле и в других иммунофенотипических группах РМЖ, генотип +250AG Lta также выявлен чаще (60,9% против значений от 35,3 до 39,7% в остальных группах). Достоверным оказалось отличие частоты гиперэкспрессии Her-2/neu вне зависимости от рецепторного статуса в

группе гомозигот *+250AA Lta*, в которой оно составило 6,5%, от группы с наличием аллеля G, в которой Her-2/neu гиперэкспрессия выявлена в 12,5% ($p < 0,05$). В целом во всех изученных группах не выявлено отличий частот аллелей и генотипов TNFR1 и TNFR2 в связи с Her-2/neu статусом.

Иной характер имели связи изученных генотипов и рецепторного статуса опухолей. Установлено, что генотип *-308GG TNF- α* чаще (88,2%) встречается при высоком уровне экспрессии рецепторов эстрогенов, чем при рецептор-отрицательном статусе (74,4%). При этом имеется тенденция к превалированию генотипов с аллелем *-308GG TNF α* по мере снижения экспрессии ER: при высоком уровне генотипы с аллелем *-308GG TNF α* составили 11,7%, при среднем 23,6%, при низком 20,0%, при отрицательном ER статусе 15,6%.

Гомозиготный генотип *+1663 GG TNFR2* достоверно чаще встречался при высоком уровне экспрессии рецепторов эстрогенов в сравнении с рецептор-негативной группой (44,1% против 31,2%; $p = 0,05$).

Таким образом, генетические полиморфизмы факторов некроза опухолей и их рецепторов ассоциированы с формированием рака молочной железы. Наибольшее число ассоциаций выявлено для генетических полиморфизмов *-308GA TNF α* и *+250AG Lta*. Концентрация высокопродуктивного аллеля *-308A TNF α* и генотипа *-308GA TNF α* ассоциирована с патогенетически значимой соматической патологией, семейно-наследственной отягощенностью, прогностически худшими рецептор-отрицательными и Her2/neu гиперэкспрессирующими вариантами карцином молочной железы. При первой стадии заболевания достоверно преобладает гомозиготный генотип *-308GG TNF α* . Имеются ассоциации *+250A/G Lta* с семейно-наследственной отягощенностью, наличием фоновых и сопутствующих доброкачественных изменений в молочных железах, сопутствующей гинекологической патологии у пациенток с РМЖ. На основании полученных данных сделаны следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. Генетические полиморфизмы фактора некроза опухолей α (*-308G/A TNF α*), лимфотоксина α (*+250A/G Lt α*), рецепторов фактора TNF α 1-го (*+36A/G TNFR1*) и 2-го (*+1663A/G TNFR2*) типов ассоциированы с формированием, клиническими и иммунофенотипическими особенностями рака молочной железы.

2. У пациенток с РМЖ, имеющих эндокринно-метаболические факторы риска, концентрация генотипа *-308GA TNF α* в 2 раза выше (21,20% против 11,10%), а частота генетического варианта *+1663 AG TNFR2* - в 1,5 раза ниже (38,0%) в сравнении с больными без эндокринно-метаболических факторов риска (56,12%). При сопутствующей гинекологической патологии (гиперпластические процессы в эндометрии, нарушения функций яичников) достоверно преобладает генотип *+250AG Lta* (42,86% против 32,04%).

3. Больные с семейно-наследственной отягощенностью онкологического анамнеза отличаются в 2 раза большей частотой аллеля -308A *TNF α* (15,66% против 7,49%), большей частотой генетического варианта -308AA *TNF α* , в 3 раза большей частотой генотипа +250GG *Lt α* (12,50% против 3,59%) в сравнении с пациентками без семейно-наследственной отягощенности.

4. Молекулярно-генетические маркером первой клинической стадии опухолевого процесса является гомозиготный генотип -308GG *TNF α* , частота которого достоверно выше (90,63%) в сравнении с третьей стадией (72,06%). При третьей стадии опухоли в сравнении как с первой (54,84%), так и со второй (48,65%) достоверно выше частота аллеля +36A *TNFR1* (55,7%).

5. Иммунофенотипические особенности рака молочной железы связаны с возрастом, T-стадией заболевания. С возрастом достоверно увеличивается частота полного рецептор-позитивного статуса. Частота гиперэкспрессии белка Her2/neu в 4 раза выше ($p < 0,05$) в возрастной группе до 35 лет и во всех возрастных группах связана с T-стадией (при T₁ стадии она составляет 7,1%, при T₃ – 15,7%; $p < 0,05$).

6. Генетические полиморфизмы -308G/A *TNF α* и +250A/G *Lt α* ассоциированы с иммунофенотипическими подтипами рака молочной железы. Частота прогностически неблагоприятной гиперэкспрессии Her2/neu у пациентов с генетическими вариантами -308AA *TNF α* и -308GA *TNF α* почти в 2 раза выше (14,9%), чем у пациенток с генотипом -308GG *TNF α* (7,9%; $p < 0,05$). Генотипы +250GG *Lt α* и +250AG *Lt α* связаны с достоверно большей частотой Her2/neu 3+ случаев в сравнении с генотипом +250AA *Lt α* (12,4% против 6,5%; $p < 0,05$).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В комплексе методов диагностики рака молочной железы при наличии эндокринно-метаболических факторов риска и наследственной отягощенности онкологического анамнеза целесообразно молекулярно-генетическое исследование полиморфизмов -308G/A *TNF α* , +250A/G *Lt α* .

2. При определении факторов биологического прогноза рака молочной железы в качестве дополнительного метода рекомендуется молекулярно-генетическое исследование полиморфизмов -308G/A *TNF α* при низком уровне экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона, при сомнительных результатах Her2/neu тестирования и гиперэкспрессии Her2/neu по результатам иммуногистохимического исследования.

3. Выявленные генетические полиморфизмы -308G/A *TNF α* , +250A/G *Lt α* целесообразно учитывать в динамике наблюдения за пациентками с пролиферативной патологией молочных желез и при определении групп риска развития рака молочной железы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Взаимосвязь пролиферативной активности, рецепторного статуса и Her2/neu статуса в раке молочной железы / А. А. Должиков, А. А. Котляров, **О. В. Луговая** [и др.] // Актуальные вопросы фармакологии и фармации : сб. тр. межвуз. науч. конф., посвящ. памяти проф. В. В. Пичугина и 75-летию КГМУ / Курск. гос. мед. ун-т, Центр.-Чернозем. науч. центр РАМН, Рос. акад. естеств. наук [и др.] ; редкол.: В. А. Лазаренко [и др.]. – Курск, 2009. – С. 171-172.
2. Анализ результатов фармакодиагностики рака молочной железы / А. А. Должиков, А. В. Иванов, ... **О. В. Луговая** [и др.] // Актуальные вопросы фармакологии и фармации : сб. тр. межвуз. науч. конф., посвящ. памяти проф. В. В. Пичугина и 75-летию КГМУ / Курск. гос. мед. ун-т, Центр.-Чернозем. науч. центр РАМН, Рос. акад. естеств. наук [и др.] ; редкол.: В. А. Лазаренко [и др.]. – Курск, 2009. – С. 173-174.
3. Иммунофенотип и клинические характеристики рака молочной железы: анализ взаимосвязей / А. А. Должиков, А. А. Котляров, **О. В. Луговая** [и др.] // Актуальные вопросы экспериментальной и клинической морфологии : сб. тр. науч.-практ. конф., посвящ. памяти чл.-корр. РАМН, проф. В. Б. Писарева, Волгоград, 15-16 апр. 2010 г. / Волгогр. гос. мед. ун-т, Волгогр. науч. центр РАМН [и др.] ; под ред. В. И. Петрова. – Волгоград, 2010. – С. 207-211.
4. Иммунофенотипические варианты рака молочной железы, генетические и конституциональные факторы риска / А. А. Должиков, **О. В. Луговая**, М. И. Чурносков [и др.] // Охрана репродуктивного здоровья – будущее России : материалы всерос. конф. с междунар. участием, посвящ. десятилетию каф. акушерства и гинекологии мед. фак. БелГУ, Белгород, 11-12 марта 2010 г. / БелГУ, Департамент здравоохранения и соц. защиты населения Белгор. обл., Белгор. обл. клинич. больница святителя Иоасафа. – Белгород, 2010. – С. 230-232.
5. Иммунофенотипические варианты и клинико-морфологические особенности рака молочной железы / А. А. Должиков, В. А. Нагорный, ... **О. В. Луговая** [и др.] // Современные аспекты патоморфологической диагностики, клиники и лечения рака молочной железы. Вопросы организации патологоанатомической службы : материалы конф. врачей-патоморфологов и врачей-онкологов Центр. федер. округа с междунар. участием, Воронеж, 22-23 апр. 2010 г. / Департамент здравоохранения Воронеж. обл., Воронеж. гос. мед. акад. ; гл. ред. И. Э. Есауленко. – Воронеж, 2010. – С. 58-60.
6. Взаимосвязи клинических, иммунофенотипических вариантов рака молочной железы с показателями репродуктивного здоровья и конституциональными факторами / А. А. Должиков, **О. В. Луговая**, Т. С. Мухина [и др.] // Репродуктология: новые технологии, проблемы и перспективы : материалы всерос. конф. с элементами науч. шк. для молодежи, Белгород, 12-15 окт. 2010 г. / БелГУ, Департамент

здравоохранения и соц. защиты Белгор. обл., Белгор. обл. клинич. больница святителя Иоасафа. – Белгород, 2010. – С. 155-158.

7. **Луговая, О. В.** Рак молочной железы у пациенток с сопутствующей гинекологической патологией / О. В. Луговая // Репродуктология: новые технологии, проблемы и перспективы : материалы всерос. конф. с элементами науч. шк. для молодежи, Белгород, 12-15 окт. 2010 г. / БелГУ, Департамент здравоохранения и соц. защиты Белгор. обл., Белгор. обл. клинич. больница святителя Иоасафа. – Белгород, 2010. – С. 158-160.

8. Особенности рака молочной железы в пожилом и старческом возрастах / А. А. Должиков, М. И. Чурносков, **О. В. Луговая** [и др.] // Геронтологический журнал им. В. Ф. Купревича. – 2010. – № 2. – С. 52-53. – (Геронтологические чтения-2010 : материалы третьей междунар. науч.-практ. конф., Белгород, 11-12 нояб. 2010 г.).

9. Ангиогенез в раке молочной железы: клиничко-морфологические и прогностические аспекты / А. А. Должиков, М. И. Чурносков, ... **О. В. Луговая** // Человек и его здоровье. – 2010. – № 4. – С. 148-155.

10. **Луговая, О. В.** Полиморфизм генов цитокинов у населения Белгородской области и молекулярно-генетические факторы в развитии рака молочной железы / О. В. Луговая, М. И. Чурносков, А. А. Должиков // Медицинский академический журнал. – 2010. – Т. 10, № 5. – С. 57.

11. Должиков, А. А. Распределение генетического полиморфизма +250 A/G лимфотоксина α среди женского населения Центрального Черноземья и его связь с раком молочной железы / А. А. Должиков, **О. В. Луговая**, М. И. Чурносков // Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков, Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010 г. : тез. докл. / Рос. о-во мед. генетиков, РАМН [и др.]. – Ростов н/Д, 2010. – С. 56.

12. Некоторые особенности распределения клинически значимых молекулярно-генетических маркеров рецепторов фактора некроза опухолей α 1 и 2 типов среди женского населения Центрального Черноземья / **О. В. Луговая**, Н. А. Горяинова, А. А. Должиков [и др.] // Материалы VI съезда Российского общества медицинских генетиков, Ростов-на-Дону, 14-18 мая 2010 г. : тез. докл. / Рос. о-во мед. генетиков, РАМН [и др.]. – Ростов н/Д, 2010. – С. 104-105.

13. Сравнительное иммуноморфологическое исследование первичных карцином молочной железы различных молекулярно-генетических типов и их метастазов в регионарных лимфоузлах / А. А. Должиков, М. И. Чурносков, **О. В. Луговая** [и др.] // Человек и его здоровье. – 2011. – № 4. – С. 98-102.

14. Фиброаденомы молочной железы. Случай цистосаркомы (злокачественной филоидной фиброаденомы) / А. А. Должиков, Т. С. Мухина, ... **О. В. Луговая** [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18, № 2. – С. 143-144.

15. **Луговая, О. В.** Исследование распределения полиморфных генетических маркеров фактора некроза опухолей альфа и его рецептора 2

типа у пациенток с раком молочной железы / О. В. Луговая // Медико-биологические аспекты мультифакториальной патологии : сб. материалов II всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Курск, 17-19 мая 2011 г. / Адм. Курск. обл., Курск. гос. мед. ун-т, Рос. акад. естеств. наук [и др.]. – Курск, 2011. – С. 73-74.

16. **Луговая, О. В.** Анализ ассоциаций полиморфизмов генов факторов некроза опухолей и их рецепторов с иммунофенотипическими особенностями рака молочной железы / О. В. Луговая, А. А. Должиков, М. И. Чурносков // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19, № 2. – С. 123-125.

Список использованных сокращений

PMЖ – рак молочной железы

TNF – фактор некроза опухолей

Lt – лимфотоксин

TNFR – рецепторы фактора некроза опухолей

ER – рецепторы эстрогенов

PgR – рецепторы прогестерона

Her2/neu – рецепторы эпидермального фактора роста II типа