
КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 618.19–006.6–037:(618.3+618.63)

ПРОГНОЗ И ТЕЧЕНИЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ФОНЕ БЕРЕМЕННОСТИ И ЛАКТАЦИИ: ВИРУСНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

А.А. Пароконная¹, А.А. Лушникова¹, Л.Н. Любченко¹,
Е.Б. Полевая¹, Н.И. Поспехова²

ГУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н.Блохина РАМН», г. Москва¹
Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва²

Исследованы клинико-патологические особенности у 68 пациенток с РМЖ на фоне беременности (РМЖАБ) в зависимости от рецепторного статуса и гистологии опухолей, носительства мутаций генов *BRCA1/2* и MMTV-родственного провируса. Показано, что по сравнению с больными спорадическим РМЖ аналогичного возраста в данной группе значительно повышена частота мутации 5382insC в экзоне 20 гена *BRCA1* (17,6 % против 5 %). У больных РМЖАБ по сравнению с больными спорадическим РМЖ также повышена частота обнаружения в лимфоцитах периферической крови и опухолевой ткани MMTV-родственных последовательностей (63% против 38–40 %). При этом у MMTV-позитивных больных по сравнению с MMTV-негативными снижена общая и безрецидивная выживаемость. Обсуждается значимость полученных результатов для ранней диагностики и прогноза РМЖАБ.

Ключевые слова: рак молочной железы, беременные и лактирующие женщины, герминальные мутации генов *BRCA1/BRCA2*, MMTV-родственный провирус, выживаемость больных, прогноз заболевания.

PROGNOSIS AND PROGRESS OF BREAST CANCER DURING PREGNANCY OR LACTATION: VIRAL AND GENETIC FEATURES

A. A. Parokonnaya¹, A. A. Lushnikova¹, L. N. Lyubchenko¹, E. B. Polevaya¹, N. I. Pospekhova².
N.N. Blokhin Cancer Research Center RAMS, Moscow¹
Medical Genetics Scientific Center RAMS, Moscow²

Clinical-pathological features were analyzed in 68 patients suffered with pregnancy-associated breast cancer (PABC) depending on the tumor receptors, histology, *BRCA1/2* mutations and MMTV-related proviral sequences occurrence. A frequency of the 5382insC mutation in the exon 20 of *BRCA1* gene in PABC patients was significantly higher than in age-matched sporadic BC ones (17.6% against 5%). The MMTV-related sequences in PABC patients were also revealed more frequently than in sporadic BC ones (63% against 39%). The overall and recurrence-free survival rates in MMTV-positive patients with PABC were significantly less than in the MMTV-negative patients. Importance of the data obtained for PABC early diagnosis and prognosis is under discussion.

Key words: breast cancer, pregnant and lactational women, germinal mutations of *BRCA1/BRCA2* genes, MMTV-related provirus, survival, disease prognosis.

Рак молочной железы, ассоциированный с беременностью (РМЖАБ), встречается у 1 из 3000 беременных женщин. Диагностика и лечение рака молочной железы (РМЖ) у таких пациенток представляет трудности как из-за анатомо-физиологических особенностей лактирующей молочной железы, так и вследствие отсутствия четких данных о факторах, влияющих на прогноз и течение заболевания в этой группе больных РМЖ [6, 7, 9].

Известно, что более трети всех случаев РМЖ в возрасте до 30 лет может быть связано с высокопенетрантными мутациями в генах *BRCA1/2* (Breast Cancer Associated); доля *BRCA1* (мутация 5382 insC) и *BRCA2*-ассоциированного семейного РМЖ составляет 45 % и 35 % соответственно. Ген *BRCA1* содержит 22 кодирующих и 2 некодирующих экзона, а соответствующий белок состоит из 1863 аминокислот и играет исключительно важную роль в поддержании целост-

ности генома. Ген *BRCA2* включает 26 экзонов и кодирует белок из 2329 аминокислот, так же как и продукт гена *BRCA1*, участвующий в регуляции транскрипции, репарации и гомологичной рекомбинации ДНК. Полагают также, что гены *BRCA1/2* являются супрессорами клеточной пролиферации [4, 5].

Международная база данных (Breast Cancer Information Core, <http://www.genome.nih.gov>) содержит свыше 300 различных вариантов мутаций генов *BRCA 1/2*. Наиболее распространенной мутацией гена *BRCA1* в странах Восточной Европы, включая и Россию, является мутация 5382 insC в экзоне 20. Частота этой мутации в генетически отягощенных семьях составляет от 10 до 63 %. Как показало исследование, выполненное в ГУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН», в 78,6 % случаев наследственный РМЖ ассоциирован с мутацией 5382 insC в экзоне 20 гена *BRCA1* [5]. Поскольку наличие этой мутации в гене *BRCA1* обуславливает очень высокий риск заболевания в семьях, на первом этапе в группе беременных и лактирующих пациенток с РМЖ было важно оценить именно частоту 5382 insC.

С другой стороны, известно о защитной роли беременности у носительниц мутаций в гене *BRCA1* в возрасте до 40 лет, в то время как риск РМЖ у носительниц мутаций в гене *BRCA2* с каждой последующей беременностью увеличивается на 15 %. Возможно, эти различия связаны с разным гормональным статусом опухолей, в первом случае они чаще эстроген-негативные, во втором – эстроген-позитивные. Механизмы защитного действия беременности пока не вполне ясны и требуют дальнейшего изучения [7, 10].

Вирус опухолей молочных желез мышей (MMTV), открытый в 1936 г., передается с материнским молоком и вызывает РМЖ у чувствительных линий мышей. Около 30 лет назад в сыворотке крови ряда больных РМЖ был обнаружен антиген, родственный белку оболочки этого ретровируса [1, 3]. Затем с помощью специфичных ПЦР в образцах ДНК, выделенной из ЛК и опухолевой ткани, но не из нормальной ткани, у 38–40 % пациенток со спорадическим РМЖ и у 52 % больных из отягощенных семей были выявлены последо-

вательности, на 93–97 % гомологичные гену *gp52*-кодирующей области гена *env* MMTV и длинным концевым повторам провируса (LTR). Как у мышей, так и у человека интеграция провируса в геном хозяина носит случайный характер, а его экспрессия гормонозависима [4, 8]. Однако обнаруженные в молоке некоторых больных и здоровых кормящих женщин MMTV-подобные вирусные частицы для человека не контагиозны. MMTV-родственный провирус был выделен и клонирован из легочного экссудата пациенток с РМЖ. Показано экзогенное происхождение MMTV-родственного провируса и вероятность ретровирусной инфекции человека через желудочно-кишечный тракт с последующей диссеминацией провируса через лимфоидные клетки и его амплификацией в активно делящихся клетках эпителия молочных желез [2]. Как полагают, MMTV-родственный провирус может индуцировать быстро растущие опухоли, возникающие в сравнительно молодом возрасте (до 40 лет), для которых характерен многофокусный рост без метастазов и быстро прогрессирующее течение заболевания [2, 3]. Об участии MMTV-родственного провируса в канцерогенезе молочных желез (а возможно, и других органов) известно немного [2, 4]. Однако показана возможность трансформации эпителиальных клеток человека как в присутствии инфекционного MMTV, так и при совместном их культивировании с мышинными клетками, продуцирующими ретровирус. Доказана также способность MMTV распространяться в культуре клеток эпителия человека, взаимодействуя с соответствующими клеточными рецепторами и встраиваясь в клеточный геном [4, 8]. При исследовании образцов ДНК из ЛК и опухолевой ткани у 63 % пациенток с РМЖ на фоне беременности и лактации нам удалось обнаружить последовательности, на 95–97 % гомологичные гену *env* MMTV, а также провирусным LTR. Близкие результаты (62 %) были получены также американскими исследователями. Это достоверно выше, чем частота обнаружения MMTV-родственного провируса у больных спорадическим РМЖ, и сравнимо с частотой у больных семейным РМЖ.

Целью исследования являлась оценка клинико-патологических и генетических особенно-

стей РМЖАБ для характеристики возможных факторов риска, а также для своевременной диагностики и лечения этой категории больных.

Материал и методы

Проведен анализ клинико-патологических особенностей РМЖАБ в репрезентативной группе, состоящей из 68 больных, в зависимости от рецепторного статуса и гистологии опухолей, носительства мутаций в генах предрасположенности *BRCA1/2* и наличия MMTV-родственных последовательностей в лимфоидных клетках (ЛК) и опухолевой ткани пациенток.

Большинство пациенток в исследованной группе заболели РМЖ в молодом возрасте – от 21 до 46 лет (mean 32,7 ± 5,24 года; 95% ДИ 31,5–34,0; медиана – 32 года), причем 75 % из них наблюдались в ГУ «РОИЦ им. Н.Н. Блохина РАМН» с 2003 по 2007 г. Поэтому мы оценили выживаемость больных с интервалами 1 год, 3 и 5 лет наблюдения. Время наблюдения за больными составило от 3 до 360 мес (mean 28,3 ± 45,9 мес; 95% ДИ 17,19–39,45; медиана – 14,5 мес).

На фоне беременности заболели РМЖ – 36 (52,9 %) больных, на фоне лактации – 24 (35,3 %), в течение 1-го года после завершения беременности – 8 (11,8 %) пациенток. В анамнезе у больных было от 1 до 15 беременностей (mean 3,26 ± 2,77; 95 % ДИ 2,59–3,93; медиана – 2,0). Возраст менархе у 58,82 % больных (n=40) составил 12 лет, у 25 % (n=17) – 13 лет.

Преимущественно наблюдались РМЖ IIА (23,52 %) и IIIА (23,52 %) стадий, с локализацией опухоли как в правой – 33 случая (48,5 %), так и в левой – 35 случаев (51,5 %) молочной железе. Синхронный РМЖ наблюдался в 4 (5,9 %) случаях. При этом рак второй молочной железы выявлен у 2 (2,94 %) пациенток. Мультицентричные опухоли отмечены в 11,8 % (n=8). Преимущественно опухоли располагались в верхне-наружном квадранте молочной железы (41,2 %). У 61,7 % (n=42) больных был выявлен инфильтративно-протоковый, у 13,2 % (n=9) – инфильтративно-протоковый с преобладанием внутрипротокового компонента, у 14,7 % (n=10) – инфильтративно-дольковый, у 5,9 % (n=4) – смешанный рак. Отмечены также карцинома *in situ* (1,47 %), рак Педжета в со-

четании с инфильтративным протоковым раком (1,47 %), редкая форма РМЖ – папиллярный рак (1,47 %). Степень «отграниченности» опухоли от окружающих тканей определена при патоморфологическом исследовании опухоли у 54 пациенток. Из них «хорошо отграниченный опухолевый узел» наблюдался у 20,6 % (n=14), «плохо отграниченный опухолевый узел» – у 58,8 % (n=40) больных. Распространение раковых клеток по лимфатическим щелям наблюдалось в 36,8 % (n=25) случаев, отсутствие метастатических лимфатических узлов в аксиллярной зоне – в 42,6 % (n=29). Степень злокачественности определена у 41 пациентки, при этом наиболее часто отмечалась II степень (53,6 %), затем III (39,0 %) и I (7,3 %) злокачественности. Рецепторы опухоли были биохимически и/или иммуногистохимически выявлены с помощью стандартных методов у 66 больных. «Рецептороположительные» опухоли выявлены у 35 (54,7 %) пациенток, «рецепторотрицательные» – у 29 (45,3 %). У 50 пациенток с помощью иммуногистохимических стандартных методов определена экспрессия гена *Her-2/neu*, его гиперэкспрессия отмечена в 15 (30 %) случаях, отсутствие экспрессии – в 35 (70 %) случаях. Индекс пролиферации Ki-67 был «положительным» у 14 из 24 пациенток (58,3 %) и «отрицательным» – у 10 (41,6 %) пациенток.

У 68 пациенток из исследуемой группы с помощью специфичных ПЦР с последующим конформационно-чувствительным электрофорезом и секвенированием ПЦР-продуктов исследовали наличие наиболее частой для российской популяции мутации гена 5382 insC в экзоне 20 гена *BRCA1*. Для выявления MMTV-гомологичных последовательностей в ДНК из лимфоцитов, лимфоузлов и опухолевой ткани использовали специфичную ПЦР с парами праймеров к *gp52*-кодирующей области гена *env* MMTV (1-2) и 3' LTR MMTV (3-4): (1) 5'-ATCCTCACTGCCAGATCGC-3'; (2) 5'-AATCTGTGGCATACTAAAGG-3'; (3) 5'-GGTGGCAACCAGGGACTTAT-3'; (4) 5'-CGAACAGACACAAACACACG-3'. Для ПЦР использовали оптимизированные наборы с Taq-полимеразой (Silex, Москва) и следующий режим: 3 мин – 94 °C, затем 30 циклов – 94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин 30 с и термина-

ция при 72 °С – 5 мин. Геномную ДНК из ЛК, лимфоузлов и опухолевой ткани выделяли, как было описано ранее [2, 3]. ДНК из архивных образцов ткани, заключенной в парафин, выделяли с помощью набора Invisorb Genomic DNA Kit II (Invitex, USA) по инструкции производителя.

Результаты и обсуждение

В анализируемой группе пациенток с РМЖАБ обнаружено 12 носительниц (17,6 %) мутации 5382 insC в экзоне 20 гена *BRCA1*, что значительно выше, чем популяционная частота данной мутации при спорадическом РМЖ у пациенток моложе 35 лет (не более 5 %). Поскольку далеко не у всех больных с РМЖАБ в анамнезе регистрируется семейная отягощенность РМЖ, можно лишь предполагать, что доля пациенток с семейной формой РМЖ в данной группе в действительности очень высока. Следовательно, данные о случаях рака в семье необходимо включать в анамнез каждой из пациенток рассматриваемой группы. При наличии мутаций в гене *BRCA1* риск РМЖ в возрасте до 70 лет составляет 35 %. В отсутствие семейной истории мутации в генах *BRCA1/2* тем не менее значительно повышают риск РМЖ по сравнению со средним популяционным риском. Кроме того, при активной пролиферации низкодифференцированных клеток и быстром росте молочной железы в начале беременности любые нарушения репарации ДНК и клеточного цикла, связанные с такими мутациями, могут иметь более драматические последствия, чем при спорадическом раке. Дело в том, что доля делящихся клеток с генетическими нарушениями в растущей на фоне беременности железе, а поэтому и вероятность появления очагов опухолевого роста в такой железе может быть выше, чем при отсутствии стимулированной гормонами про-

лиферации клеток органа. Особая роль в опосредованном гормонами росте, по-видимому, принадлежит низкодифференцированным стволовым клеткам молочной железы, что требует дальнейшего изучения [7, 10].

В исследованной группе пациенток с РМЖАБ выявлено 43 (63 %) носительницы последовательностей, гомологичных гену *env* и 3'LTR MMTV. Анализ полученных данных показывает, что среди MMTV-положительных больных достоверно чаще встречаются пациентки с начальными стадиями РМЖ (I–IIA), без метастатических лимфоузлов в аксиллярной зоне. При этом соотношение опухолей с такими характеристиками, как распространение раковых эмболов по лимфатическим щелям, плохо отграниченный опухолевый узел, гиперэкспрессия гена *Her-2/neu*, выше в группе MMTV-положительных пациенток.

Анализ состояния регионарных лимфатических узлов в зависимости от наличия или отсутствия метастатического поражения позволил разделить больных РМЖАБ на две группы с различным прогнозом течения заболевания и определить, влияет ли на прогноз носительство MMTV. Установлено, что MMTV-негативные больные с метастазами в аксиллярные лимфатические узлы имеют 100 % общую выживаемость, безрецидивная выживаемость начинает снижаться с 1-го года наблюдения. Носительство MMTV отрицательно влияет на оба показателя выживаемости, при этом общая выживаемость начинает снижаться с 3-го года, а безрецидивная – с 1-го года наблюдения ($p > 0,05$) (табл. 1).

В группе MMTV-негативных больных без метастатических лимфатических узлов общая и безрецидивная выживаемость равняется 100 % на протяжении всего периода наблюдений (табл. 2). Напротив, за время наблюдения умерло

Таблица 1

Показатели отдаленной выживаемости у больных РМЖАБ с метастазами в лимфоузлы в зависимости от носительства MMTV (M±m)

MMTV	Общая выживаемость (%)			Безрецидивная выживаемость (%)		
	1 год	3 года	5 лет	1 год	3 года	5 лет
MMTV+ (n=23)	100	75,6 ± 12,4	63,0 ± 15,4	95,6 ± 4,2	51,5 ± 15,6	51,5 ± 15,6
MMTV- (n=16)	100	100	100	93,3 ± 6,4	74,6 ± 17,4	49,7 ± 23,0
	p=0,11088			p=0,42534		

Таблица 2

Общая и безрецидивная выживаемость больных с РМЖАБ без метастазов в лимфоузлы, в зависимости от носительства MMTV (M±m)

MMTV	Общая выживаемость (%)			Безрецидивная выживаемость (%)		
	1 год	3 года	5 лет	1 год	3 года	5 лет
MMTV+ (n=20)	100	70,0 ± 14,4	46,6 ± 21,3	93,3 ± 6,4	62,2 ± 15,2	41,7 ± 19,7
MMTV- (n=9)	100	100	100	100	100	100
	p=0,33770			p=0,19499		

5 из 20 (25 %) MMTV-положительных больных, у которых исходно не было регионарных метастазов. В группе MMTV-положительных больных наблюдалась тенденция к снижению общей выживаемости, начиная с 3 года наблюдения, и безрецидивной выживаемости, начиная с 1-го года наблюдения (p>0,05) (табл. 2).

При динамическом наблюдении локальные рецидивы отмечены только в группе MMTV+. Отдаленные метастазы (метастазы в печень, легкие, головной мозг, средостение) в этой группе встречаются достоверно чаще и достоверно чаще приводят к смерти. Эти данные отражаются на динамике общей выживаемости таких больных, при общей 5-летней выживаемости в группе MMTV-негативных пациенток, равной 100 %, общая выживаемость в группе MMTV-положительных достоверно ниже (табл. 3). При этом прогрессирование заболевания отмечается как в первой, так и во второй группе, начиная с 1-го года наблюдения. Частота безрецидивной выживаемости среди положительных и негативных пациенток одинакова. Однако несмотря на это, прогноз и течение болезни в этих группах различны. Анализ динамики появления метастазов показывает, что за «пятилетний» срок наблюдения в группе MMTV-положительных пациенток

выявлено 5 (11,6 %) больных с метастазами в печень, из них дожила до 5 лет лишь 1 пациентка. После 5 лет наблюдения метастазы в печень выявлены еще у 2 (4,6 %) больных. Все эти больные умерли. В течение 5 лет наблюдения в группе MMTV-негативных больных метастазы в печень были выявлены у 3 больных (12 %). Тем не менее все они пережили «контрольный» (5-летний) срок. Позже метастазы в печень были отмечены еще у 1 (4 %) больной, которая также продолжала жить и после «контрольного» срока. Метастазы в легкие выявлены только в группе MMTV-положительных больных. Все эти пациентки умерли в течение 5-летнего срока наблюдения (табл. 3).

Как было отмечено, MMTV может инфицировать эпителиальные клетки человека *in vitro*; кодируемые геном *env* MMTV аминокислотные последовательности (тирозин-богатые активационные мотивы) соответствуют последовательностям клеточных иммунорецепторов (ITAM), вовлеченных в регуляцию дифференцировки и пролиферации клеток [4, 8]. Не исключено и опосредованное влияние MMTV-родственной инфекции на иммунный статус пациенток, а следовательно, и на прогрессирование заболевания, а также выживаемость

Таблица 3

Общая и безрецидивная выживаемость в группе больных РМЖАБ в зависимости от носительства MMTV-родственного провируса, M±m

MMTV	Общая выживаемость (%)			Безрецидивная выживаемость (%)		
	1 год	3 года	5 лет	1 год	3 года	5 лет
MMTV+ (n=43)	100	72,4 ± 9,6	57,0 ± 12,3	94,1 ± 4,1	63,6 ± 10,0	47,7 ± 12,3
MMTV- (n=25)	100	100	100	95,8 ± 4,0	79,8 ± 14,9	59,8 ± 20,6
	p=0,04715			p=0,14538		

больных. Таким образом, исследование большой группы больных РМЖАБ показало:

1. У больных РМЖ на фоне беременности и лактации по сравнению с больными спорадическим РМЖ повышена частота мутации 5382insC в гене *BRCA1* (17,6 % против 5 %). Это указывает на более частую семейную отягощенность таких больных, повышающую риск заболевания. На фоне беременности клинические проявления наследственной отягощенности могут быть более выраженными и с более ранней манифестацией заболевания, чем в отсутствие беременности и соответствующих морфофункциональных изменений молочной железы. При этом следует учитывать и защитную роль беременности у молодых эстроген-положительных носительниц мутаций в гене *BRCA1*.

2. У больных РМЖАБ повышена частота носительства MMTV-родственных последовательностей (63,3 % против 39–40 % при спорадическом РМЖ).

3. У носителей MMTV-родственного провируса выявлен ряд особенностей течения РМЖ, отрицательно влияющих на показатели общей и безрецидивной выживаемости, по сравнению с MMTV-негативными пациентами. Это подтверждает возможную роль MMTV-родственного провируса в канцерогенезе молочной железы человека как фактора риска вирусной природы.

4. Для ранней диагностики и прогноза заболевания оправдано клиничко-генетическое консультирование всех беременных женщин с

отягощенной семейной историей и тщательное наблюдение их маммологом. Данные вирусно-генетического анализа полезны для оценки течения и прогноза заболевания больных РМЖАБ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 07-04-00564а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Крюкова И.Н., Лушикова А.А., Маливанова Т.Ф. О возможном участии ретровирусов в индукции рака молочной железы человека // Вопросы вирусологии. 2002. № 4. С. 4–9.
2. Лушикова А.А., Крюкова И.И., Ротин Д.Л., Любченко Л.Н. Обнаружение последовательностей, гомологичных гену *env* MMTV, в лимфоидной ткани кишечника больной раком молочной железы // Доклады Академии наук. 2004. Т. 399, № 1. С. 118–121.
3. Лушикова А.А., Крюкова И.Н., Пароконная А.А., Полевая Е.Б. Обнаружение *env* MMTV-гомологичных последовательностей у беременных и кормящих женщин с опухолями молочных желез // Молекулярная медицина. 2006. № 2. С. 11–16.
4. Лушикова А.А. MMTV и канцерогенез молочных желез у человека // Молекулярная медицина. 2007. № 4. С. 19–26.
5. Любченко Л.Н., Портной С.М., Поспехова Н.И. и др. Клиничко-молекулярные аспекты наследственного рака молочной железы // Молекулярная медицина. 2007. № 1. С. 8–14.
6. Пароконная А.А., Нечушкин М.И., Кампова-Полевая Е.Б. Рак молочной железы и беременность // Маммология. 2005. № 1. С. 15–20.
7. Britt A., Ashworth A., Smalley M. Pregnancy and the risk of breast cancer // *Endocr. Relat. Cancer*. 2007. Vol. 14, № 4. P. 907–933.
8. Faschinger A., Rouault F., Sollner J. et al. Mouse mammary tumor virus integration site selection in human and mouse genomes // *J. Virol*. 2007. № 21. P. 324–348.
9. Keleher A.J., Theriault R.L., Gwyn K.M. et al. Multidisciplinary management of breast cancer concurrent with pregnancy // *J. Am. Coll. Surg*. 2002. Vol. 194, № 1. P. 54–64.
10. Russo J., Balogh G., Russo I.H. Breast cancer prevention // *Climacteric*. 2007. Suppl. 2. P. 47–53.

Поступила 21.12.07