

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РЕНТГЕНРАДИОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

ВАРДАНЯН СЕРГЕЙ ГАСПАРОВИЧ

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ТИПИРОВАНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ДЛЯ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОПТИМАЛЬНОЙ ТАКТИКИ СИСТЕМНОГО
ЛЕЧЕНИЯ**

14.01.12 – Онкология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук, профессор
Боженко Владимир Константинович

Москва 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Молекулярные факторы, определяющие тактику системного лечения и прогноза у больных раком молочной железы	19
1.2 Молекулярно-генетическая классификация рака молочной железы	25
1.3 Модели определения фенотипа опухоли на основе методов ПЦР и микроматричного анализа	33
1.3.1 Варианты мультигенных моделей для прогнозирования исхода заболевания у больных РМЖ с применением метода ПЦР	35
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1 Общая характеристика клинического материала	45
2.2 Методы исследования	48
2.3 Статистические методы обработки материала	53
Глава 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (Результаты исследования).	54
3.1 Сопоставление значений молекулярных маркеров у больных раком молочной железы, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР	54
3.1.1 Корреляция уровней экспрессии рецепторов эстрогена в основном опухолевом узле, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР	54
3.1.2 Корреляция уровней экспрессии рецепторов прогестерона в основном опухолевом узле, определяемых методами ИГХ и ОТ-	

ПЦР	58
3.1.3 Корреляция уровня эпидермального фактора роста Her2/neu в основном опухолевом узле, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР	61
3.1.4 Корреляция уровня маркера клеточной пролиферации Ki67 в основном опухолевом узле, определяемого методами ИГХ и ОТ-ПЦР	65
3.2 Молекулярное типирование рака молочной железы по результатам ИГХ и ОТ-ПЦР исследований	67
3.3 Соотношение результатов типирования рака молочной железы, определяемых иммуногистохимическим и ОТ-ПЦР методами исследования	79
3.4 Анализ молекулярного фенотипа в первичном опухолевом узле и пораженных регионарных лимфатических узлах	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ	96
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	97
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АХТ	–	адьювантная химиотерапия
БРВ	–	безрецидивная выживаемость
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГХ	–	иммуногистохимическое исследование
кДНК	–	комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	–	матричная рибонуклеиновая кислота
ОТ-ПЦР	–	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПР	–	показатель рецидива
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РВ-ПЦР	–	полимеразная цепная реакция в реальном времени
РМЖ	–	рак молочной железы
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
РП	–	рецепторы прогестерона
РЭ	–	рецепторы эстрогенов
ХТ	–	химиотерапия
BIRC5	–	Vaculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 (бакуловиральный ингибитор ответа апоптозных повторов 5 сурвивин)
BCL2	–	B-cell lymphoma 2 (ген В-клеточной лимфомы 2)
BAG1	–	BCL2-Associated Athanogene (BCL2-ассоциированный анатоген)
CCNB1	–	cyclin B1 (циклин B1)
CCND1	–	cyclinD1 (циклинD1)
CTSL2	–	Cathepsin L2 (ген, регулирующий активность катепсина L2)
CD68	–	Cluster of Differentiation 68 (кластер дифференцировки 68)
ESR1	–	Estrogen receptor (1 ген экспрессии рецепторов эстрогена)
GRB7	–	Growth factor receptor-bound protein 7 (ген рецептор-

- связанного фактора роста 7)
- HER2 – Human epidermal growth factor receptor 2 (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2)
- HMGB1 – High-mobility group protein B1 (ген экспрессии маммоглобина)
- NDRG1 – N-Myc Downstream Regulated (N-Мус-подавляющий ген)
- MKI67 – Marker of proliferation Ki-67 (маркер клеточной пролиферации Ki-67)
- MYC – MYC proto-oncogene (протоонкоген MYC)
- MYBL2 – Myeloblastosis oncogene-like 2 (онкоген миелобластоза 2 типа)
- MMP11 – Matrix metalloproteinase 11 (ген матричной металлопептидазы 11)
- P16INK4A – Cyclin-dependent kinase inhibitor (ген-регулятор, циклин-зависимого ингибитора киназы 4 A)
- PTEN – phosphatase and tensin homolog (гомолог фосфатазы и тензина)
- PGR – Progesterone receptor (ген экспрессии рецепторов прогестерона STK-15)
- TERT – Telomerase reverse transcriptase (ген обратной транскриптазы)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

На сегодняшний день рак молочной железы (РМЖ) уверенно занимает лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний среди женского населения [22, 126, 140], а также является основной причиной смерти от опухолевого процесса у данной категории пациенток. Главными причинами, обуславливающими высокие показатели летальных исходов, остаются прогрессирующее заболевание на разных этапах более чем у половины больных, а также недостаточная эффективность проводимого системного лечения [32, 42].

В настоящее время разнообразие особенностей и течения рака молочной железы объясняется различными биологическими и морфологическими характеристиками опухолевых клеток [7, 37, 118]. Результатами многих исследований было подтверждено, что РМЖ является гетерогенным процессом и объединяет в себе заболевания с различными факторами риска, подходами к лечению, а также различными показателями выживаемости [41, 85, 102, 169].

Согласно отечественным и международным рекомендациям выбор терапии и определение прогноза при раке молочной железы в настоящее время определяется биологическими характеристиками опухоли и назначается с учетом ее молекулярных подтипов, к которым относятся люминальный тип А, люминальный тип В (Her2-отрицательный), люминальный тип В (Her2-положительный), Her2-положительный и базальноподобные (трижды негативные) опухоли [59, 161, 190]. Для определения молекулярного подтипа РМЖ используется иммуногистохимический метод, с помощью которого в основном опухолевом узле и метастатических очагах оцениваются поверхностная экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестерона, статус рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu, а также маркер клеточной пролиферации Ki67 [134, 172].

Несмотря на то, что классификация на основании иммуногистохимических маркеров получила широкое признание и применение, этот метод имеет ограниченную способность и может привести к погрешностям в постановке правильного диагноза. Прежде всего, это обусловлено техническими недостатками, которые могут быть связаны с возможными нарушениями методологии выполнения исследования, а также с так называемым «субъективным фактором», проявляющимся возможностью неправильной интерпретацией полученных результатов. Исследования многих ученых показывают, что основанная на иммуногистохимическом исследовании классификация имеет ряд недостатков/ограничений, так Cianfrocca M. et.al. продемонстрировали, что только 73% злокачественных образований молочной железы с наличием экспрессии рецептора эстрогена относятся к люминальным А и В подтипам [47]. В настоящее время активно обсуждается диагностическая ценность маркера клеточной пролиферации Ki67, определяемого методом ИГХ, и его значение в разделении РЭ-позитивных подтипов РМЖ. По рекомендациям St.Gallen от 2013 года необоснованным было признано само пограничное значение уровня Ki67, а уже в 2015 году серьезному обсуждению подверглась информативность значения Ki67 в 20% [48].

Исследованию молекулярных фенотипов в онкологии посвящено большое количество публикаций, в частности, для РМЖ разработано несколько молекулярно-генетических панелей на основе определения экспрессии генов [184, 199]. Однако данные панели в большей степени направлены на анализ течения и оценку риска прогрессирования заболевания, и в меньшей – несут информацию о чувствительности опухоли к проводимому лечению. Используемая в настоящее время панель Prosigna информативна в отношении возможности идентификации подтипов РМЖ. Определённую сложность также представляет статистическая обработка полученных на основании данной модели данных, что существенно ограничивает ее использование в клинической практике [203].

Все вышесказанное обуславливает необходимость разработки и внедрения новых методов фенотипирования рака молочной железы, что позволит существенно повысить чувствительность и специфичность исследования по сравнению с использованием классической ИГХ модели. В частности, в настоящее время на базе ФГБУ «Российского научного центра рентгенорадиологии» (РНЦРР) разработана отечественная мультигенная панель, определяемая методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), с включением генов, отвечающих за основные механизмы жизнедеятельности опухолевой клетки: клеточная пролиферация, апоптоз, клеточная дифференцировка и межклеточное взаимодействие [2].

Степень разработанности темы

Несмотря на распространение иммуногистохимического метода исследования, точное определение ряда молекулярных маркеров у больных раком молочной железы остается актуальной проблемой в современной онкологии. В настоящее время изучаются молекулярно-генетические панели на основе экспрессии генов, однако в большинстве случаев их использование направлено на оценку риска прогрессирования заболевания, а не анализа чувствительности опухоли к системному лечению.

В последние годы для этих целей активно идет изучение отечественной мультигенной панели, определяемой методом ПЦР и включающей гены, ответственные за основные механизмы жизнедеятельности опухолевых клеток, что несомненно является актуальным научным направлением.

Цель исследования

Изучить клиническую значимость отличий определения фенотипических признаков опухоли на основании морфологических и молекулярно-генетических методов у больных раком молочной железы.

Задачи исследования

1. Сопоставить результаты исследования рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона), рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu и маркера клеточной пролиферации Ki67, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР, у больных раком молочной железы.
2. Проспективно изучить молекулярно-генетический профиль злокачественных опухолей молочной железы с применением мультигенной панели, состоящей из 24 генов и определяемой методом ОТ-ПЦР.
3. Сравнить результаты распределения рака молочной железы на подтипы с использованием метода ОТ-ПЦР с данными иммуногистохимического анализа и оценить их клиническую значимость.
4. Провести сравнительный анализ молекулярного фенотипа первичной опухоли и пораженных регионарных лимфатических узлов у больных раком молочной железы и оценить клиническую значимость выявленных отличий.

Научная новизна

Впервые проведена сравнительная оценка экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона) и рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu методами ИГХ и ОТ-ПЦР у больных раком молочной железы и показана целесообразность дополнительного использования метода ОТ-ПЦР в случаях с низкими и отрицательными значениями данных маркеров, определяемых иммуногистохимическим анализом.

Впервые на основании сопоставления результатов ИГХ исследования маркера клеточной пролиферации Ki67 с данными ОТ-ПЦР продемонстрирована нецелесообразность использования данного параметра в качестве индикатора разделения молекулярных подтипов РМЖ, а также показана необходимость дополнительного применения комплекса показателей

пролиферации для более достоверного определения принадлежности опухоли к определённому фенотипу.

Впервые на репрезентативной группе больных проведено проспективное исследование по изучению молекулярно-генетического профиля рака молочной железы с использованием панели из 24 генов (Ki67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68, GUSB, HPRT1, B2M), определяемых с помощью ОТ-ПЦР, которое показало, что сочетание данного метода со стандартным иммуногистохимическим анализом существенно повышает информативность и точность распределения злокачественных опухолей молочной железы на молекулярные подтипы.

Впервые изучен молекулярно-генетический фенотип первичного опухолевого узла и пораженных регионарных лимфатических узлов у больных раком молочной железы с применением иммуногистохимического исследования и мультигенной панели, а также показаны отличия, диктующие необходимость выявления дополнительных характеристик опухолевых очагов для назначения адекватного системного лечения данной категории пациентов.

Теоретическая и практическая значимость

Показано, что для более точного и информативного определения статуса рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона) и статуса Her2/neu у больных раком молочной железы необходимо сочетание иммуногистохимического и ОТ-ПЦР исследований, особенно для категории пациентов с низким уровнем экспрессии данных параметров.

Установлено, что маркер клеточной пролиферации Ki67 не является достаточным критерием для разделения рака молочной железы на Люминальный А и В подтипы, а для более точного соотнесения злокачественной опухоли к молекулярному фенотипу необходимо дополнительное изучение комплекса показателей пролиферации.

Подтверждена возможность распределения рака молочной железы на подтипы с использованием отечественной панели, состоящей из 24 генов (Ki67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68, GUSB, HPRT1, B2M) и определяемой методом ОТ-ПЦР.

Показана необходимость определения молекулярно-генетических характеристик опухоли в первичном узле и пораженных регионарных лимфатических узлах, что будет способствовать более точной диагностике и назначению адекватной системной терапии у больных раком молочной железы.

Методология и методы исследования

В исследование включено 358 больных раком молочной железы ($T_{1-3}N_{0-3}M_0$), которым проводились морфологический, иммуногистохимический и молекулярно-генетический анализы операционного материала с исследованием основного опухолевого узла, также у 64 пациенток были проведены исследования метастатических аксиллярных лимфатических узлов.

В ходе работы выполнялась оценка основных молекулярных маркеров рака молочной железы (рецепторы к эстрогену и прогестерону, рецептор эпидермального фактора роста Her2/neu, маркер клеточной пролиферации Ki67) путем их изучения методами ИГХ и ОТ-ПЦР с последующим сравнением результатов исследования. Также проводилось сопоставление молекулярных подтипов первичной опухоли, выявленных на основании данных иммуногистохимического и ОТ-ПЦР исследований.

Осуществлялось сопоставление фенотипов опухолевой ткани первичного узла и метастатических лимфатических узлов с применением методов ИГХ и ОТ-ПЦР. Полученные данные были проанализированы и обработаны корректными методами статистического анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Для более точной оценки рецепторного статуса опухоли (рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста Her2/neu), а также маркера клеточной пролиферации Ki67 у больных раком молочной железы необходимо сочетание стандартного иммуногистохимического исследования с анализом генной экспрессии, определяемой методом ОТ-ПЦР.
2. Сочетание стандартного иммуногистохимического анализа с изучением панели из 24 генов (Ki67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68, GUSB, HPRT1, B2M), определяемой методом ОТ-ПЦР, существенно повышает информативность и точность распределения злокачественных опухолей молочной железы на подтипы.
3. Для назначения адекватной тактики системного лечения у больных раком молочной железы целесообразно изучение молекулярно-генетических характеристик первичного опухолевого узла и пораженных регионарных лимфатических узлов.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов проведенного исследования подтверждается достаточным количеством вошедших в исследование больных (n=358), высоким методологическим уровнем с применением современных высокоинформативных клинических, диагностических, морфологических и молекулярно-генетических методов исследования.

Апробация работы

Основные положения диссертации были доложены на Всероссийском Конгрессе с международным участием «Амбулаторно-поликлиническая

практика: диагностика, лечение, профилактика» (Москва, 2016); XIII Тихоокеанском медицинском Конгрессе с международным участием (Владивосток, 2016); XXXI International Congress of the IAP and 28th Congress of the ESP (Cologne, Germany, 2016).

Результаты диссертационного исследования доложены на заседании научно-практической конференции и совета по апробациям кандидатских диссертаций ФГБУ «Российского научного центра рентгенорадиологии» Минздрава России 02.07.2018 г.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для публикации материалов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Личный вклад автора

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на этапах отбора вошедших в исследование пациенток, проведении этапов хирургического вмешательства и системного лечения, заборе материала на морфологическое и молекулярно-генетическое исследования, оценке результатов исследования, их обработке, интерпретации, а также непосредственная подготовка научных публикаций и написание всех глав диссертации.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста и состоит из введения, материала и методов, результатов исследования,

заклучения, выводов, практических рекомендаций, а также списка литературы. Работа иллюстрирована 26 таблицами и 21 рисунками. Библиографический указатель содержит 227 источников литературы, их них 16 отечественных и 211 иностранных.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

На сегодняшний день рак молочной железы (РМЖ) [5, 20, 140] уверенно занимает лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний среди женского населения [22, 126], а также является основной причиной смерти у данной категории пациенток [32, 42]. Главными причинами, обуславливающими высокие показатели летальных исходов, остаются прогрессирующие заболевания, отмечаемое на разных этапах более чем у половины пациенток с раком молочной железы [115, 139, 141], а также недостаточная эффективность проводимого системного лечения [4, 33]. Активное проведение скрининговых программ и постановка диагноза на ранних стадиях позволили существенно улучшить показатели пятилетней выживаемости [12, 12, 182]. Тем не менее, примерно у половины больных могут развиваться отдалённые метастазы в различные периоды после проведенного комбинированного лечения, так наиболее часто диссеминация процесса отмечается на 2-3 год с сохранением риска метастазирования также и через 5-10 лет после лечения [13, 35].

В настоящее время особенности и разнообразие течения рака молочной железы объясняются различными биологическими и морфологическими особенностями опухолевых клеток [7, 37, 118]. Результатами различных исследований подтверждено, что РМЖ является гетерогенным процессом и объединяет в себе заболевания с различными факторами риска, подходами к лечению, а также показателями выживаемости [41, 85, 102, 169]. Ранние попытки типирования РМЖ для создания дифференцированного подхода к определению объема системного лечения и прогноза заболевания в различной степени рассматривали такие параметры как возраст больной, состояние менструальной функции, распространенность опухолевого процесса и пр. [57, 94, 155, 168]. Однако большее распространение получило разделение в

зависимости от гистологического типа опухоли и степени ее злокачественности [71, 83, 200].

Гистологический тип опухоли характеризует особенности опухолевого роста и объединяет в себе ряд морфологических и цитологических особенностей, определяющих течение заболевания и ответ на проводимое лечение [4, 14, 94, 110]. Согласно четвертому изданию Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) от 2012 года по классификации принято выделять 33 гистологических подтипа рака молочной железы, наиболее распространенным из которых является неспецифический инвазивный рак (инвазивный протоковый рак) (таблица 1) [40, 100, 210, 211, 212, 213].

Степень злокачественности представляет собой оценку уровня дифференцировки ткани (выраженность тубулярных структур и ядерный полиморфизм) и пролиферативной активности (митотический индекс), субъективно отражающих степень агрессии опухоли [99, 184]. Степень дифференцировки опухоли во многом определяет течение опухолевого процесса [112, 204]. Так более высокодифференцированные опухоли характеризуются меньшей пролиферативной и метастатической активностью, в то время как низкодифференцированные обладают более агрессивным потенциалом и требуют активной терапии [118]. В настоящее время во всех злокачественных инвазивных опухолях молочной железы степень злокачественности определяется по системе градирования Scarff-Bloom-Richardson в модификации Elston-Ellis (Ноттингемской классификация) по 3 критериям: формированию железистых структур, выраженности ядерного полиморфизма и числу митозов (таблица 2) [208]. По сумме баллов каждого критерия определяется степень злокачественности:

- *Первая степень (I)* – 3 – 5 баллов (высокодифференцированный рак);
- *Вторая степень (II)* – 6 – 7 баллов (умереннодифференцированный рак);
- *Третья степень (III)* – 8 – 9 баллов (низкодифференцированный и недифференцированный рак).

Таблица 1 – Гистологические типы рака молочной железы согласно рекомендации ВОЗ от 2012 года

Нозологическа форма рака	МКБ-О	Нозологическа форма рака	МКБ-О
Инвазивный неспецифицированный рак	8500/3	Смешанный метапластический рак	8575/3
Плеоморфный рак	8022/3	Миоэпителиальный рак	8982/3
Рак с остеокластоподобными стромальными гигантскими клетками	8035/3	Высокодифференцированная нейроэндокринная опухоль	8246/3
Инвазивный неспецифицированный рак с преобладанием лимфоидной инфильтрации	8500/3	Низкодифференцированный нейроэндокринный рак/мелкоклеточный рак	8041/3
Инвазивный неспецифицированный рак с нейроэндокринной дифференцировкой	8574/3	Секреторный рак	8502/3
Инвазивный дольковый рак	8520/3	Ацинарноклеточный рак	8550/3
Тубулярный рак	8211/3	Мукоэпидермоидный рак	8430/3
Крибриформный рак	8201/3	Онкоцитарный рак	8290/3
Муцинозный рак	8480/3	Светлоклеточный рак, богатый гликогеном	8315/3
Медулярный рак	8510/3	Рак сальных желез	8410/3
Инвазивный микропапиллярный рак	8507/3	Отечно-воспалительный рак	8530/3
Метапластический неспецифицированный рак	8575/3	Богатый липидами рак	8314/3

Железисто-плоскоклеточный рак низкой степени злокачественности	8571/3	Богатый гликогеном рак	8315/3
Фиброматозоподобный метапластический рак	8572/3	Полиморфный рак низкой степени злокачественности	8525/3
Метапластический рак с плоскоклеточной метаплазией	8070/3	Смешанный метапластический рак	8575/3
Метапластический рак с веретеноклеточной метаплазией	8032/3	Миоэпителиальный рак	8982/3
Метапластический неспецифицированный рак	8575/3	Высокодифференцирова нная нейроэндокринная опухоль	8246/3
Метапластический рак с костной дифференцировкой	8571/3	Низкодифференцирован ный нейроэндокринный рак/мелкоклеточный рак	8041/3

Проведенные в дальнейшем исследования продемонстрировали определенную условность данного разделения рака молочной железы в отношении клинической эффективности, что проявляется низкой чувствительностью к проводимому лечению [205, 224].

Таблица 2 – Степень злокачественности рака молочной железы по системе Scarff-Bloom-Richardson

Признак	Балл
<i>Формирование железистых структур</i>	
>75% от площади опухоли	1
10 – 75% от площади опухоли	2
< 10% от площади опухоли	3
<i>Ядерный полиморфизм</i>	
Мелкие однотипные ядра	1
Умеренное увеличение размера	2
Выраженный полиморфизм	3
<i>Митотическая активность</i>	
Зависит от диаметра/площади поля зрения	
<i>Степень злокачественности</i>	
1	Сумма баллов 3 – 5
2	Сумма баллов 6 или 7
3	Сумма баллов 8 или 9

Данный факт может объясняться, как отсутствием стандартизованных подходов к формированию критериев классификаций и большой вариабельностью патоморфологических диагнозов, так и низкой распространенностью некоторых типов РМЖ с отсутствием их включения в систематические исследования по классификации и прогнозу.

Все эти аргументы обуславливали необходимость поиска новых более чувствительных маркеров, характеризующих биологическую природу опухоли и обеспечивающих обоснованный выбор тактики терапии.

1.1. Молекулярные факторы, определяющие тактику системного лечения и прогноза у больных раком молочной железы

Молекулярные параметры играют существенную роль [28, 158, 160] для определения особенностей течения опухолевого процесса, а также для решения вопроса относительно выбора тактики системного лечения у больных раком молочной железы (таблица 3) [58, 108, 119, 177].

Таблица 3 – Основные группы биологических маркеров при раке молочной железы

<i>Биологическое значение</i>	<i>Маркеры</i>
Показатели эндокринной гормональной чувствительности	Рецепторы стероидных гормонов: рецепторы эстрогенов и прогестерона
Показатели активности ауто/паракриновой регуляции пролиферации	Факторы роста и их рецепторы: EGFR и его лиганды: α -TNF, амфирегулин и пр. Her2/neu и другие рецепторы семейства EGFR Рецепторы IFR-1 Рецепторы соматостатина
	Ферменты и белки, участвующие в митогенных сигналах: рецепторные тирозинкиназы, MAP-киназы, PIK3, Akt-1, Crb2 и др.
Показатели метастатической и инвазивной активности	Компоненты системы активизации плазминогена: uPA, PAI-1, рецептор uPARPAI-2, tPA
	Металлопротеиназы и их ингибиторы
	Другие протеолитические ферменты (катепсинD)

Продолжение таблицы 3.

	Интегрины
Показатели неоангиогенеза	VEGFA и его рецепторы fit-1 flk-1
	VFGFC и его рецепторы fit-4
	Другие ангиогенные факторы: тимидинфосфорилаза, интерлейкины и др.
Регуляторы апоптоза	Супрессорные гены и их продукты: p53, ген ретинобластомы
	Проапоптотические факторы: BCL-2, Fas-рецептор и Fas-лиганд
Показатели, не имеющие четко выраженной биологической роли при РМЖ	Белок pS2
	Онкогены c-мус, int-2 и др.

В настоящее время с развитием современных молекулярных технологий появилось огромное количество различных параметров [59, 161, 190], однако наиболее значимыми по-прежнему являются рецепторы к стероидным гормонам (эстрогену и прогестерону), рецептор эпидермального фактора роста Her2/neu, а также маркер клеточной пролиферации Ki67 [134, 172].

Рецепторы стероидных гормонов. Первые шаги на пути к пониманию молекулярно-генетической природы РМЖ были сделаны еще в 1960-х годах [81, 196], когда злокачественные опухоли молочной железы были разделены на два типа в зависимости от наличия/отсутствия экспрессии *рецепторов эстрогена (РЭ)*, расположенных на поверхности мембран опухолевых клеток [93]. РЭ-позитивные опухоли наблюдаются в 75% случаев РМЖ и характеризуются более высокой степенью дифференцировки, менее агрессивным клиническим течением и относительно благоприятным прогнозом по сравнению с РЭ-негативным РМЖ [53, 225]. Экспрессия *рецепторов*

прогестерона (РП) [38, 174] на ядерной мембране клеток аденокарциномы положительно коррелирует с экспрессией рецепторов эстрогена [54, 218], свидетельствует об активации эстроген-зависимых сигнальных путей и наблюдается в 65-75% случаев [64, 105, 224]. В настоящее время выделяют 2 вида РЭ, к которым относятся РЭ α и РЭ β [65, 107], при этом клиническое значение имеет только α -форма данного рецептора стероидных гормонов. В РП также выделяются 2 изоформы (РПА и РПВ), определяемые иммуногистохимическим методом (ИГХ) [74, 193, 199].

Главным клиническим значением рецепторов стероидных гормонов является назначение гормональной терапии для больных раком молочной железы, которая может включать использование антиэстрогенов (тамоксифен, торемифен), селективных инактиваторов рецепторов эстрогена (фульвестрант) [110, 170, 171], ингибиторов ароматазы третьего поколения (анастрозол, летрозол и экземестан), агонистарилизинг-гормонагонотропных гормонов гипофиза (LH-RH) (гозерелин) и пр [55, 95]. В качестве предсказательных маркеров рецепторы стероидных гормонов применяются для планирования неoadъювантной и адъювантной терапии, а также лечения больных с метастатическими формами РМЖ [213, 224].

Метаанализ 20 рандомизированных клинических исследований (n=21,457) по изучению раннего рака молочной железы продемонстрировал, что гормональная терапия РЭ-положительных опухолей тамоксифеном в течение 5 лет снижает риск развития рецидива заболевания на 39% и смертности на 30% [162]. Напротив, терапия тамоксифеном у пациентов с РЭ-негативными опухолями МЖ не влияет на данные параметры. Результаты данного метаанализа показали, что высокий уровень экспрессии РП находится в независимой корреляции с ответом на лечение тамоксифеном, эффективностью к лечению и общей выживаемостью у больных с метастатическим РМЖ. При сравнении результатов 5-летней адъювантной терапии ингибиторами ароматазы третьего поколения и тамоксифена у больных РМЖ, находящихся в

состоянии менопаузы, отмечалось лишь незначительное улучшение (1-2%) показателей безрецидивной (БРВ) и общей выживаемости (ОВ).

Несмотря на то, что в течение длительного времени стандартом лечения больных с РЭ-позитивным РМЖ было пятилетнее использование тамоксифена или ингибиторов ароматазы, результаты дальнейших исследований продемонстрировали лучшие показатели выживаемости при их 10-летнем приеме.

Являясь главным образом предсказательными параметрами, рецепторный статус также может рассматриваться в качестве дополнительной информации в отношении прогноза заболевания. Так несколько ретроспективных анализов показали, что у пациентов с наличием экспрессии РЭ и РП отмечается лучший прогноз по сравнению с больными, имеющими отрицательные значения.

Маркер клеточной пролиферации Ki67. Маркер клеточной пролиферации Ki67 является белковым комплексом с молекулярной массой 345-395 кДа, изменение уровня экспрессии которого отмечается в зависимости от фазы клеточного цикла с пиком в фазе митоза и минимальными значениями в фазе G0 [104, 159]. На данный момент Ki67 рассматривается в качестве предсказательного параметра для определения эффективности неoadьювантного и адьювантного лечения [121]. Большинство источников указывают на корреляцию высокого уровня данного показателя с ответом на проведение химиотерапии в неoadьювантном режиме, проявляемым клинико-рентгенологической или морфологической регрессией [188]. Также имеются данные о целесообразности учета уровня маркера клеточной пролиферации при назначении адьювантной химиотерапии, в частности добавление доцетаксела к эпирубицину и 5-фторурацилу. Подобные результаты были получены и при сочетании курс ХТ с метотрексатом, циклофосфамином и 5-фторурацилом в сочетании с последующей гормонотерапией у больных РМЖ с РЭ-позитивным статусом без вовлечения в процесс лимфатических узлов.

Множество исследований, включая ретроспективную оценку рандомизированных клинических испытаний и метаанализов, продемонстрировали, что высокий уровень Ki67 является независимым маркером неблагоприятного прогноза у больных раком молочной железы. В одном из крупнейших исследований Petrellietal. выполнил анализ литературы с последующим метаанализом 41 исследований, включающих 64196 пациентов. Несмотря на то, что указывались различные отсечки в диапазоне от 10 до 25% и более, наибольшее прогностическое значение для показателей общей выживаемости было выявлено при уровне экспрессии Ki67 25% и более.

Важнейшая роль отводится индексу клеточной пролиферации Ki67 для разделения «Люминального А» и «Люминального В» подтипов [49, 145]. При этом, основным недостатком иммуногистохимической классификации является низкая согласованность в типировании данных молекулярных подтипов [63, 146]. Люминальный тип В демонстрирует более высокий уровень пролиферативной активности по сравнению с Люминальным типом А [82, 150]. Несмотря на это, проведение дифференциального ряда между ними заняло какое-то время. Впервые данный вопрос обсуждался в рамках международной конференции в St.Gallen в 2011 году, когда «низкий пролиферативный индекс» был установлен в значении менее 14%. В тоже время уже в 2013 году на той же конференции большинство участников проголосовало о «высоком статусе» Ki67 со значением $\geq 20\%$. При этом несколько работ подняли проблему низкой воспроизводимости результатов анализа маркера клеточной пролиферации в различных лабораториях, что привело к тому, что в 2015 году по результатам конференции в St. Gallen интерпретация уровня маркера клеточной пролиферации должна проводиться с учётом местных лабораторных показателей. Например, при среднем значении Ki67 равном 20% при эстроген-позитивном РМЖ, значение в 30% или выше может считаться высоким, а 10% или менее низким [48].

Рецептор эпидермального фактора роста Her2/neu. Рецептор эпидермального фактора роста Her2/neu относится к семейству поверхностных

трансмембранных рецептов EGFR, наличие экспрессии которого выявляется на поверхности опухолевых клеток при раке легкого, яичников, желудка, простаты и пр. [1, 15]. Особое место среди злокачественных новообразований занимает рак молочной железы, гиперэкспрессия и/или амплификация гена Her2 клетками при котором относится к одному из неблагоприятных прогностических факторов, обуславливающих агрессивное течение опухолевого процесса, а также низкие показатели общей и безрецидивной выживаемости [36, 135]. По данным различных исследований частота вновь выявленных случаев инвазивного РМЖ с гиперэкспрессией Her2/neu составляет 15-25% [44]. По результатам различных исследований пациенты с Her2-положительным фенотипом РМЖ лучше отвечают на химиотерапию [50, 219].

Главным образом необходимость определения статуса Her2/neu обусловлена тем фактом, что гиперэкспрессия данного молекулярного параметра является показанием для назначения таргетной терапии (трастузумаб, пертузумаб, лапатиниб, трастузумаб эмтанзин), применяемой, как в неoadьювантном и адьювантном режимах, так и для лечения метастатических форм рака молочной железы [52, 124].

Исследование статуса Her2/neu может быть выполнено путем количественного анализа уровня экспрессии белка – иммуногистохимическое исследование (ИГХ исследование) или путем определения амплификации гена Her2 с использованием методов гибридизации *in situ* (флуорисцентная и хромогенная гибридизация *in situ*). При проведении ИГХ исследования и оценке полученных результатов традиционно используются следующие критерии [62, 138]:

- «0» – отсутствие окрашивания или окрашивание менее 10% опухолевых клеток с любой интенсивностью;
- «1+» – слабое неполное мембранное окрашивание более 10 % опухолевых клеток;
- «2+» – от слабого до умеренного окрашивания всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток;

- «3+» – сильное окрашивание всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток.

В сомнительных случаях, выражаемых экспрессией Her2 (2+), выполняется флуорисцентная (FISH) или хромогенная (CISH) гибридизация *in situ* [67]. При FISH-гибридизации оценку наличия амплификации гена Her2 проводят путем подсчета соотношения красных флуоресцентных (соответствующих помеченным генам Her2) и зеленых флуоресцентных сигналов, которыми помечен центромерный участок 17-й хромосомы. Соотношение больше 2,2 свидетельствует о наличии амплификации Her2.

1.2. Молекулярно-генетическая классификация рака молочной железы

Проведенные многочисленные попытки в отношении типирования рака молочной железы с учетом различных клинических и морфологических характеристик не принесли желаемого результата [44, 136]. Все это привело к тому, что в 2000 году Perou et. al., используя технологию микрочипирования к мРНК для получения индивидуальных экспрессионных профилей опухоли и кластерный анализ, определил пять различных экспрессионных паттернов. Основываясь на этом, злокачественные опухоли молочной железы были разделены на 5 молекулярных подтипов: люминальные подтипы А и В; подтип с положительной экспрессией Her2/neu, базальный подтип и подтип, подобный нормальной ткани молочной железы (normal-like) [68, 149]. В дальнейшем существование последнего было опровергнуто. Практически одновременно с этим, Sorlie et. al. в 2001, также используя технологию микрочипирования, выделил две большие подгруппы РМЖ в зависимости от наличия отсутствия/или низкой экспрессии РЭ [103, 185, 201].

1. РЭ-отрицательные опухоли:

1а. Опухоли подобные базальному эпителию молочной железы. Характеризуются высокой экспрессией кератинов 5 и 17, ламинина, протеина 7, связывающего жирные кислоты;

1b. Подгруппа Her2 +. Опухоли с высокой экспрессией некоторых генов 17q22.24, включая ERBB2 и GRB7;

1с. Опухоли, подобные нормальным клеткам молочной железы. Имеют самую выраженную экспрессию многих генов, известных для жировой ткани и клеток других неэпителиальных тканей. Эти опухоли демонстрировали также выраженную экспрессию генов базального эпителия и низкую экспрессию генов люминального эпителия.

2. РЭ-положительные опухоли:

2а. Люминальный подтип А. Клетки демонстрируют высочайшую экспрессию гена РЭ и эстроген-регулируемого LIV-1;

2б. Люминальный подтип В. Клетки имеют умеренную или низкую экспрессию генов, специфичных для люминального типа, включая кластер РЭ;

2с. Люминальный подтип С. Клетки имеют те же характеристики, что и клетки люминального типа В, отличаются от последних высокой экспрессией генов, координирующая функция которых неизвестна, имеющих сходные черты с генами, экспрессирующимися в опухолях, подобных базальному эпителию, и Her2-позитивному подтипу (таблица 4).

Таблица 4 – Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы (ESMO 2018)

Молекулярно-биологический подтип	ИГХ критерии	Рекомендуемая системная терапия
Люминальный А	<i>Наличие всех факторов:</i> <ul style="list-style-type: none"> • РЭ положительный • РП высокий (> 20%) • Her2-отрицательный • Ki67 низкий (< 20%) 	Только гормональная терапия
Люминальный В (Her2-отрицательный)	<ul style="list-style-type: none"> • РЭ положительный • Her2/neu отрицательный <i>и наличие одного из следующих факторов:</i> <ul style="list-style-type: none"> • РП низкий (< 20%) • Ki67 высокий (> 30%) 	Гормональная терапия + химиотерапия в большинстве случаев
Люминальный В (Her2 положительный)	<ul style="list-style-type: none"> • РЭ положительный • Her2/neu положительный • РП любые • Ki67 любой 	Гормональная терапия + химиотерапия + Анти-Her2 терапия
Her2-позитивный (нелюминальный)	<ul style="list-style-type: none"> • Her2 -положительный • РЭ и РП отрицательные 	Химиотерапия + Анти-Her2 терапия
Базальный (трижды-негативный рак)	<ul style="list-style-type: none"> • РЭ, РП, Her2/neu отрицательные 	Химиотерапия

Позднее были описаны более редкие фенотипы, такие как апокриновый, низкоклаудиновый и интерфероновый. Появление понятия молекулярного (внутреннего, биологического) фенотипа связано с тем, что субстратом для

формирования опухоли являются различные группы клеток эпителия молочной железы (в частности, базальный и люминальный эпителий) [153]. Эти исследования продемонстрировали, что РЭ-позитивные и РЭ-негативные РМЖ являются принципиально разными по биологической природе типами опухолей [69, 104].

Приблизительно 75% опухолей РМЖ относятся к люминальному фенотипу, при котором экспрессируются РЭ и РП, а также ряд других генов сигнальных путей стероидных гормонов и гены, кодирующие белки люминального эпителия. В различных исследованиях встречается разный набор генов, характеризующих люминальный фенотип, что вероятно обусловлено различным набором генов, включенных в исследование и использованием разных методов кластеризации [86]. Huet. al. объединили результаты классификации трех больших независимых исследований, что позволило выявить два подтипа люминального РМЖ (люминальный подтип А и люминальный подтип В), что позднее было подтверждено другими авторами [120].

Подобное разделение способствовало укреплению пониманию того, что выделенные подтипы рака молочной железы отличаются друг от друга не только по прогнозу заболевания (показатели общей и безрецидивной выживаемости) и морфологическим характеристикам опухоли (таблица 5), но и чувствительностью опухоли к различным видам системной терапии [87].

Люминальный тип А. Люминальный тип А является наиболее распространенным фенотипом, составляя 50-60% от всех опухолей РМЖ [17, 79]. Как правило опухоли с Люминальным типом А характеризуются низкой степенью злокачественности, низким уровнем ядерного полиморфизма, низкой митотической активностью и по морфологическим характеристикам наиболее часто представляют собой тубулярный, инвазивный крибриформный, муцинозный и дольковый рак [24, 25]. Люминальный фенотип А характеризуется высоким уровнем экспрессии генов рецепторов *ESR1* и *PGR* и низкой активностью пролиферативных молекулярных каскадов [106], также для

них характерна экспрессия люминальных цитокератинов СК8, СК18 и генов, ассоциированных с эстроген-зависимыми молекулярными каскадами (*LIV1*, ядерный фактор гепатоцитов 3 альфа (*FOXA1*), X-бох связывающий протеин 1 (*XBP1*), *GATA* связывающий протеин 3 (*GATA3*), ген В-клеточной лимфомы 2 (*BCL2*), *erbB3* и *erbB4* [69].

Пациенты с люминального фенотипом А обычно имеют благоприятный прогноз и низкую частоту рецидивирования по сравнению с другими подтипами РМЖ [66].

Люминальный фенотип В. Наблюдается в 18-20% случаев РМЖ и характеризуется более высокой пролиферативной активностью, высокой степенью злокачественности и неблагоприятным прогнозом по сравнению с Люминальным типом А [18, 76]. Главным отличием люминальных подтипов является повышенный уровень экспрессии генов, участвующих в пролиферативных каскадах (*v-MYB*, *GGN*, *LAPTMВ4*, *NSEP1* и *CCNE1*), а также имеется амплификация онкогена *HER2* и генов 17q ампликона и амплификация высокого уровня 8p11-p12, 8q21-q24, 20q13; гиперактивация ключевых промоторов клеточного цикла (например, *cyclin E1*) и клеточного роста (например, *TOPO II*) [43, 53].

Для данного молекулярного подтипа характерен значительно более худший прогноз и большая вероятность рецидивов, чем при других рецептор-позитивных опухолях. Люминальный фенотип В отличается меньшей чувствительностью к гормонотерапии по сравнению с люминальным фенотипом А и одновременно меньшей эффективностью к химиотерапии по сравнению с *Her2*-позитивным и базальным фенотипами [61]. С другой стороны, эффективность химиотерапии при люминальном типе В в целом выше по сравнению с люминальным А типом, что подтверждается более выраженным терапевтическим патоморфозом [173].

Таблица 5 – Соотношение гистологических молекулярных подтипов РМЖ

Гистологический тип РМЖ	Молекулярный подтип
Инвазивный дольковый рак <ul style="list-style-type: none"> • Классический вариант • Плеоморфный вариант 	–
	Люминальный А
	Люминальный А Her2/neu- положительный подтип
Тубулярный рак	Люминальный А
Муцинозный/нейроэндокринный рак	Люминальный А
Инвазивная папиллярный рак	Люминальный А
Микропапиллярный рак	Люминальный В/С Her2/neu – положительный подтип
Апокриновый рак	Трижды-негативный подтип Her2-положительный подтип
Метапластический рак	Трижды-негативный подтип
Медуллярный рак	Трижды-негативный подтип
Аденокистозный рак	Трижды-негативный подтип
Секреторный рак	Трижды-негативный подтип

Her2-позитивный фенотип. Рецептор эпидермального фактора роста 2 принадлежит к семейству мембранных тирозинкиназных рецепторов EGFR и кодируется геном *erbB2*, лежащим на хромосоме 17q21 [8, 110, 189]. После связывания с лигандом внеклеточного домена происходит гетеродимеризация и трансфосфорилирование внутриклеточного домена [21, 131]. Для Her2 не обнаружено собственного лиганда, и его активация происходит при связывании с другими членами семейства тирозинкиназы или путем гомодимеризации при высоком уровне экспрессии [26, 30]. Фосфорилированные внутриклеточные домены активируют разнообразные молекулярные каскады, связанные с процессами пролиферации, клеточной дифференцировки, ангиогенеза, инвазии

и метастазирования. Her2-позитивный РМЖ составляет 15-20% от всех фенотипов РМЖ [31, 147] и ассоциируется с агрессивным течением опухолевого процесса и неблагоприятным прогнозом заболевания [60, 156]. Морфологически опухоли, как правило, отличаются высокой степенью злокачественности, митотическим индексом и высокой вероятностью наличия мутации p53 [78].

Базальный или «трижды-негативный» подтип РМЖ. Базальный фенотип РМЖ встречается в 27 до 39% случаев РМЖ [154] и характеризуется высокой степенью злокачественности, высоким митотическим индексом, отсутствием тубулярных структур в опухоли, а также наличием центральной зоны некроза или фиброза опухоли, лимфоваскулярной инфильтрацией и наличием медуллярных структур [29, 152]. В большинстве своем опухоли представляют собой инфильтративный протоковый рак и отличаются неблагоприятным прогнозом и высокой частотой метастазирования в головной мозг и легкие [70, 98]. Опухоли базального фенотипа экспрессируют миоэпителиальные маркеры, CK5, CK14, CK17 и ламинин, не экспрессируют – РЭ, РП и Her2/neu, в силу чего по ИГХ-характеристикам называются трижды-негативными [180]. Также для данного фенотипа характерен высокий уровень экспрессии Р-кадгерина, фасцина, кальвеолина 1 и 2, альфа-бета кристаллина и рецептора эпидермального фактора роста [97].

Важно отметить, что термины «базальный» и «трижды-негативный» в полной мере не являются синонимами. В первом случае фенотип определяется результатами микроматричного анализа, использующего до несколько тысяч мишеней, во втором случае, отражает иммуногистохимические особенности опухоли (отсутствие ИГХ экспрессии РЭ, РП и Her2/neu). Несмотря на это, трижды-негативный рак считается клинически приемлемой формой интерпретации базального фенотипа [113, 144].

Результаты иммуногистохимических исследований и микроматричного анализа свидетельствуют, что, по крайней мере, треть РМЖ базального фенотипа связаны с нарушениями BRCA-ассоциированных молекулярных

каскадов. Эти опухоли могут быть чувствительны к некоторым видам цитостатических агентов, таких как ингибиторы полимеразы поли-АДФ рибозы (PARP), что может быть следствием нарушения механизмов репарации двухнитевых разрывов ДНК в клетках.

Безусловно, использование фенотипа опухоли в качестве прогностической/предиктивной модели совершенно оправдано, т.к. понятие фенотипа объединяет большое количество молекулярных маркеров и потенциальных терапевтических мишеней, взаимодействие которых определяет молекулярную структуру опухоли. Однако, важным и не решенным остается вопрос правильной интерпретации фенотипа. Несмотря на то, что классификация на основании иммуногистохимических маркеров получила широкое признание и применение в клинической практике, этот метод имеет ограниченную способность и может привести к погрешностям и неточностям в постановке правильного диагноза. Прежде всего, это связано с техническими недостатками метода, которые обусловлены возможными нарушениями методологии выполнения исследования, а также так называемый «субъективный фактор», проявляющийся высокой возможностью неправильной интерпретацией полученных результатов. Данный факт доказывают исследования многих ученых, например Cianfrocca et. al. продемонстрировали, что только 73% злокачественных образований молочной железы с наличием экспрессии рецептора эстрогена относятся к люминальным А и В подтипам. Под сомнением также остается значение маркера клеточной пролиферации Ki-67, определяемым методом ИГХ, в разделении данных РЭ-позитивных подтипов РМЖ, подкрепляющееся тем фактом, что по рекомендациям St.Gallen от 2013 года необоснованным было признано само пограничное значение уровня Ki67, а уже в 2015 году серьезному обсуждению подверглась информативность значения Ki67 в 20% [47].

Таким образом, «классическое» иммуногистохимическое типирование РМЖ не всегда в полной мере способно охарактеризовать молекулярный

фенотип опухоли и обеспечить необходимую претенциозность в определении прогноза и выборе тактики системного лечения [178].

1.3 Модели определения фенотипа опухоли на основе методов ПЦР и микроматричного анализа

Одним из первых методов молекулярной стратификации стало изучение определенного образца ткани (single sample predictors (SSPs)) для оценки экспрессионного профиля опухоли в сравнении со средним экспрессионным профилем известных подтипов РМЖ [101, 181]. Данное разделение стало применяться в качестве предиктора эффективности проводимого лечения, а также прогнозирования исхода заболевания. Однако, со временем, накопленные данные свидетельствовали о необходимости слишком сложной статистической обработки и отсутствию возможности типирования некоторых опухолей, что подразумевало необходимость совершенствования технологии выполнения и интерпретации результатов [88, 187].

Разработка и внедрение дополнительных технологий позволила перейти к упрощенной оценке биологических свойств опухоли, для чего активно стала использоваться *полимеразная цепная реакция (ПЦР)* [19, 122], которая представляет собой молекулярно – биологический метод, позволяющий создать копии определенного фрагмента ДНК из исходного образца, повысив его содержание в пробе на несколько порядков [27, 127]. Разработанная в 1983 году американскими учеными Кэри Мюлисом ПЦР предполагала получение множества одинаковых двухцепочечных фрагментов ДНК строго определенной длины (обычно не более 2000-3000 пар нуклеотидов) для чего необходимо проведение 20-30 циклов реакции, состоящих из 3 этапов [130]:

- *Денатурация* для разъединения двух цепей ДНК-матрицы путем нагревания реакционной смеси до 94-98 °С с разрушением связи между азотистыми основаниями параллельных цепей.

- *Отжиг праймеров*, который представляет собой специфичное присоединение праймеров к освободившимся цепям ДНК – матрицы с разных сторон копируемого участка 3'-концами друг к другу для того, чтобы праймеры могли комплементарно связаться (отжечься) только с нужными участками с учетом температуры плавления (T_m). Отжиг проводят при температуре на 1-5 °С ниже T_m , но не выше оптимальной температуры работы полимеразы, то есть в пределах 40-72 °С.
- *Элонгация (или синтез ДНК)*, проводимая при температуре 72°С (оптимальной для работы *Taq*-полимеразы), при этом фермент присоединяется к комплексам праймер-матрица и, выхватывая из раствора нуклеотиды, начинает по принципу комплементарности прилаживать их к 3'-концу праймера. Удлинение, или элонгация, новой цепи ДНК идет с максимальной скоростью 50-60 нуклеотидов в секунду (то есть около 3000 в минуту). Однако при программировании ПЦР-циклера задают время с запасом: по минуте на каждую тысячу пар нуклеотидов. Каждая вновь синтезированная цепочка ДНК становится, наравне со старой, матрицей для синтеза в следующем цикле. Таким образом, количество нужного продукта в процессе реакции возрастает экспоненциально и образуется необходимое для визуализации количество специфических двухцепочечных продуктов.

Для визуализации нужных участков ДНК содержимое пробирок после окончания ПЦР подвергают электрофорезу в агарозном или полиакриламидном геле с последующим окрашиванием [143].

Основными видами ПЦР являются:

- *ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР)*, принцип которой строится на получении наглядной графической и цифровой информации о количестве молекул ДНК исследуемых генов в образце, что позволяет косвенно судить об уровне экспрессии этих генов;
- *ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)* [130], при которой в качестве основы используется матрица мРНК (матричная РНК, на основе которой строятся клеточные белки) [183]. Для этого на первом этапе происходит

«перепись» мРНК в ДНК с применением реакции обратной транскрипции, в которой фермент по матрице РНК строит комплементарную ДНК (*кДНК*), а потом с этой ДНК проводят обычную ПЦР, как описано выше [220].

Так, основываясь на методе ПЦР-РВ с применением панели генов для определения уровня экспрессии генов еще в 2003 Sorlie Т. (54 гена) и в 2007 г. Mullins М. (41 ген) продемонстрировали возможность выделения молекулярных подтипов РМЖ в 88 и 94% случаев соответственно.

1.3.1 Варианты мультигенных моделей для прогнозирования исхода заболевания у больных РМЖ с применением метода ПЦР

В настоящее время около 70% больным раком молочной железы в плане комбинированного лечения назначаются курсы химиотерапии, при этом, не у всех отмечается ответ на проведенное лечение [199]. В связи с этим, наряду с фенотипированием активно разрабатывались платформы для определения риска прогрессирования заболевания для назначения оптимальной терапии (таблица 6). Некоторые общие характеристики всех или большинства из этих много – аналитических тестов включают в себя следующие особенности [184]:

- Большинство из них были разработаны и утверждены для европейской и североамериканской популяций пациентов;
- Наиболее важные гены в мультигенных профилях для определения прогноза заболевания вовлечены в процессы клеточной пролиферации;
- Все модели несут информацию о прогнозе заболевания в отношении безрецидивной выживаемости независимо от таких традиционных прогностических параметров, как размер и степень злокачественности опухоли, а также состояния регионарных лимфатических узлов;
- Большинство моделей были изучены в отношении больных с РЭ-положительными и Her2-отрицательными опухолями без поражения регионарных лимфатических узлов в возрастной группе между 40 и 65 лет. При

этом, Oncotype DX, Mamma Print, Endo Predict и Prosigna также были изучены в отношении пациентов с вовлечением в опухолевый процесс 1-3 лимфоузлов;

- Только урокиназный активатор плазминогена (uPA)/PAI-1, Oncotype DX и Mamma Print были изучены для клинического применения в рамках рандомизированного проспективного анализа. Prosigna, Endo Predict и Genome Grade Index в настоящее время проходят данную оценку;
- Ни одна из панелей в настоящее время не может быть рекомендована для предсказания ответа на определенный вид химиотерапии;
- Несмотря на стоимость выполнения исследования, использование некоторых мультигенных сигнатур (uPA/PAI-1, Oncotype DX и Mamma Print) продемонстрировало свою экономическую эффективность в виде сокращения объемов адъювантной химиотерапии для пациентов без поражения регионарных лимфатических узлов;

Панель *Oncotype DX* разработана на основе 16 прогностических/предсказательных и 5 референсных генов с помощью ОТ-ПЦР в фиксированной формалином и парафином материале опухоли молочной железы, что является неоспоримым преимуществом [163]. На основании относительных уровней экспрессии данных генов был изучен показатель рецидива (ПР) заболевания, колеблющийся от 0 до 100. В исследование были включены пациентки с РЭ-положительными опухолями РМЖ без поражения аксиллярных лимфатических узлов, получавшие в адъювантном режиме тамоксифен, с медианой наблюдения в 10 лет [78]. При проведении стратификации пациенток в зависимости от ПР было выделено три различных группы: с низким риском развития рецидива (менее 18 – 51% пациентов), средним риском (18-31; 22% пациентов) и высоким риском рецидива заболевания (более 31-27% пациентов). Анализ результатов показал, что развитие отдаленных метастазов через 10 лет составило 6,8% для группы с низким риском, 14,3% – для группы среднего риска и 31% в группе высокого риска [140].

Для *Oncotype DX* проведено наибольшее количество валидационных исследований, по результатам которых было выявлено, что все образцы люминального фенотипа В характеризуются большим риском прогрессирования по сравнению с люминальным типом А. Следует отметить, что *Oncotype DX* является единственной платформой, одобренной Американской ассоциацией клинических онкологов и экспертами Национальной всеобщей онкологической сети США [174].

Платформа *Mamma Print* разработана на основе микроматричного анализа профиля экспрессии 70 генов для пациентов как с поражением регионарных лимфатических узлов, так и без него [166]. Первоначальным материалом для исследования были образцы опухоли, полученные от 78 пациентов РЭ-позитивным РМЖ без метастазов в лимфоузлы, не получавших в адьювантном режиме курсы химиотерапии. У 34 из 78 пациентов в последствие отмечалось прогрессирование заболевания в виде развития отдаленных метастазов. В исследуемых образцах был проанализирован уровень экспрессии 25000 генов, для 70 из которых была обнаружена выраженная корреляция с исходом заболевания, именно эти гены были включены в панель *Mamma Print* [184].

Клиническое применение *Mamma Print* было подтверждено в рандомизированном проспективном исследовании с включением 6692 больных РМЖ с поражением 0-3 метастатических л/у. В зависимости от риска рецидива заболевания, выявленных по данным исследования *Mamma Print*, пациенты распределялись на группы с высоким/низким риском – критерии G, а также по клинико-патологическим критериям – критерии С. После 5-летнего наблюдения отсутствие отдаленных метастазов у пациентов с высоким риском по критериям С и низким риском по критериям G в 94,7% случаях отмечалось независимо от назначения химиотерапии. Полученные данные привели в последующем к сокращению объема химиотерапии на 46% у больных с высоким риском по критериям С [180]. Результаты этого исследования показали, что использование теста *Mamma Print* может влиять на тактику ведения больных с РМЖ, сокращая при этом объем назначаемой химиотерапии.

Платформа *PAM50* (или *Prosigna*) разработана на основе анализа экспрессии 50 дискриминантных генов методом ПЦР в реальном времени. На основе относительной экспрессии этих генов показатель рецидива может колебаться от 0 до 100 [206]. Используя этот счет, пациентов без поражения регионарных лимфатических узлов можно разделить на группу с низким риском (0-40), промежуточным (41-60) и высоким риском (61-100), в то время как у пациентов с наличием метастазов в лимфатические узлы выделяют низкий (0-40) и высокий риск (41-100). Прогностическое значение PAM50 у постменопаузальных больных с РЭ-положительным статусом, как с поражением, так и без вовлечения в процесс лимфатических узлов было изучено в двух независимых проспективно-ретроспективных исследованиях. Проведенный анализ подтвердил независимое прогностическое значение Prosigna у больных с поражением 1-3 лимфатических узлов. Также было установлено, что Prosigna превосходит Oncotype DX или IHC4 прогнозирует развитие поздних рецидивов [203].

Кроме того, платформа PAM50 является единственной панелью, характеризующейся возможностью распределять больных РМЖ согласно 4 выделенным молекулярным фенотипам [184].

Анализируя вышенаписанное, в настоящее время по-прежнему актуальной остается разработка новых информативных инструментов для разделения рака молочной железы на различные фенотипы, что несомненно будет способствовать более точному назначению системного лечения, тем самым улучшая показатели выживаемости у данной категории пациентов.

Таблица 6 – Мультигенные модели прогнозирования у больных раком молочной железы

<i>Название теста</i>	<i>Исследуемая ткань</i>	<i>Изучаемая молекула</i>	<i>Проведение проспективных рандомизированных исследований</i>	<i>Кол-во генов</i>
uPA/PAI-I	Н/З	Белок	Продолжаются	2
Oncotype Dx	ФФП	мРНК	Продолжаются	21
Mamma Print	Н/З	мРНК	Продолжаются	70
PAM50	ФФП	мРНК	Продолжаются	50
Genomic Grade Index	ФФП	мРНК	Продолжаются	97
Breast Cancer Index	ФФП	мРНК	Нет	11
Mammo strat	ФФП	Белок	Нет	5
ИНС4score	ФФП	Белок	Нет	4
Endopredict	ФФП	мРНК	Продолжаются	11
Rotterdam signature	Н/З	мРНК	Нет	76
Oncoas TR	ФФП	мРНК	Нет	7
Curbest 95GC	ФФП	мРНК	Нет	95

Примечания: ФФП – фиксированная формалином и парафином; Н – нативная, З – замороженная

Подтипы рака молочной железы, определенные с помощью иммуногистохимического методом и включенные в руководства по типированию рака молочной железы, имеют значение в первичной диагностике РМЖ и для определения тактики системного лечения у данной категории пациентов. Несмотря на это различные исследования продемонстрировали, что подтипы, выделенные только с помощью иммуногистохимических параметров, являются субоптимальными с показателями чувствительности и специфичности около 70-80% по сравнению с анализом экспрессии генов. Так, например, от 31 до 59% Her2-позитивного рака молочной железы, выявленного с использованием ИГХ и различных методов на основе гибридизации *in situ* (ISH), можно отнести к другим молекулярным подтипам. Подобная ситуация наблюдается и в отношении трижды-негативного и люминального раков.

Существующие в настоящее время тесты на основе экспрессии генов в большей степени свидетельствуют о риске прогрессирования заболевания, в меньшей о чувствительности опухоли к проводимому лечению. Используемая в настоящее время панель Prosigna информативна в отношении возможности идентификации подтипов РМЖ. Однако определённую сложность представляет статистическая обработка полученных на основании данной модели данных, что существенно ограничивает ее использование в клинической практике.

Все вышесказанное обуславливает необходимость разработки и внедрения новых методов фенотипирования рака молочной железы, что позволит существенно повысить чувствительность и специфичность исследования по сравнению с использованием классической ИГХ-модели. В частности в настоящее время на базе ФГБУ «Российского научного центра рентгенорадиологии» (РНЦРР) разработана отечественная мультигенная модель, определяемая методом ПЦР, с включением генов, отвечающих за основные механизмы жизнедеятельности опухолевой клетки: клеточная пролиферация, апоптоз, клеточная дифференцировка и межклеточное взаимодействие. В данную панель входят следующие гены [2]:

MKI67 (маркер клеточной пролиферации *Ki67*) – кодирует ядерный белок, необходимый для клеточной пролиферации и экспрессируется в фазы G1, S, G2, M [194, 216].

STK-15 (Серин/треонин-протеин киназа 15) – является членом семейства серин/треонинкиназ, которые действуют как ключевые регуляторы сегрегации хромосом и цитокинеза. Сверхэкспрессия гена *STK15* приводит к амплификации центросом, нестабильности хромосом, анеуплоидии и трансформации.

CCNB1 (циклин B1) – кодирует белок цикли B1 из семейства циклинов, являющийся регуляторным белком контролирующим смену фаз клеточного цикла. Кодированный белок необходим для правильного контроля фазы перехода G2/M клеточного цикла [56, 203].

CCND1 (циклин D1) – белок, кодируемый этим геном, принадлежит к высококонсервативному семейству циклинов, члены которого характеризуются драматической периодичностью в избытке белка на протяжении клеточного цикла. Мутации, амплификация и гиперэкспрессия этого гена, которые изменяют прогрессию клеточного цикла, часто наблюдаются в различных опухолях и могут способствовать онкогенезу [129, 216].

MYC (протоонкоген *MYC*) – принадлежит к семейству, в которое входят *MYCL* (L-Мус) и *MYCN* (N-Мус). Протоонкоген *MYC* лежит на перекрестке многих стимулирующих рост путей передачи сигнала и обуславливает немедленный ранний ответ многих мембран-ассоциированных рецепторных комплексов. Экспрессия *MYC* строго регулируется, так что ее уровень экспрессии строго контролируется рядом механизмов, включающих множество транскрипционных регуляторных мотивов, обнаруженных в его проксимальной промоторной области [151, 175, 202].

MYBL2 (онкоген миелобластома 2 типа) – является транскрипционным фактором семейства транскрипционных факторов *MYB* и физиологическим регулятором развития клеточного цикла, выживания и дифференцировки клеток. Гиперэкспрессия *MYBL2* находится в корреляции с неблагоприятным

прогнозом при злокачественных образованиях различной локализации [116, 132, 222].

P16INK4A (ген-регулятор, циклин-зависимого ингибитора киназы 4A) – это белок, участвующий в регуляции клеточного цикла. В настоящее время p16Ink4a считается белком-супрессором опухоли из-за его физиологической роли и подавленной экспрессии в большом количестве злокачественных опухолей [96, 142, 218].

PTEN (гомолог фосфатазы итензина) – опухолевый супрессор, который мутировал в большом количестве раковых заболеваний с высокой частотой, отрицательно регулируя путь передачи сигналов АКТ/ПКВ [114, 123].

BIRC5 (Бакуловирусный ингибитор ответа апоптозных повторов 5/Сурвивин) – является членом семейства генов ингибитора апоптоза (IAP), которые кодируют негативные регуляторные белки, которые предотвращают гибель клеток апоптоза. Экспрессия генов высока во время развития плода и в большинстве опухолей, но низка во взрослых тканях [72, 191].

BCL2 (ген В-клеточной лимфомы 2) – представляет собой мембранный белок, который блокирует этап на пути, ведущем к апоптозу или запрограммированной гибели клеток. Белок, кодируемый этим геном, связывается с BCL2 и упоминается как атланоген, связанный с BCL2. Он усиливает антиапоптотический эффект BCL2 и представляет собой связь между рецепторами факторов роста и антиапоптотическими механизмами [157].

BAG1 (BCL2-ассоциированный анатоген) – является физиологическим медиатором внеклеточных сигналов выживания, связанных с клеточными механизмами, которые предотвращают апоптоз в гематопоетических и нейрональных клетках-предшественниках. Гиперэкспрессия данного параметра отмечается при многих злокачественных образованиях, включая рак молочной железы, колоректальный рак, рак эндометрия, рак простаты и рак легких. Предполагается также, что BAG-1 участвует в метастазировании [84, 192].

TERT (ген обратной транскриптазы) – представляет собой рибонуклеопротеиновую полимеразу, играющую роль в клеточном старении,

так как она обычно репрессируется в постнатальных соматических клетках, что приводит к прогрессирующему укорочению теломер. Дерегуляция экспрессии теломеразы в соматических клетках может быть вовлечена в онкогенез [45, 89].

NDRG1 (N-Мус подавляющий ген) – является членом семейства генов с пониженной регуляцией N-мус, которое принадлежит к суперсемейству альфа/бета–гидролаз. Белок, кодируемый этим геном, представляет собой цитоплазматический белок, участвующий в реакциях на стресс, гормональный ответ, рост клеток и дифференцировку. Гиперэкспрессия этого гена может быть прогностическим показателем для нескольких типов рака [39, 179].

ESR1 (ген экспрессии рецепторов эстрогена) – кодирует рецептор эстрогена, лиганд-активированный фактор транскрипции, состоящий из нескольких доменов, важных для связывания гормонов, связывания ДНК и активации транскрипции. Белок локализуется в ядре, где он может образовывать гомодимер или гетеродимер с рецептором эстрогена. Рецепторы эстрогена также участвуют в патологических процессах, включая рак молочной железы, рак эндометрия и остеопороз [23, 91, 196].

PGR (ген экспрессии рецепторов прогестерона) – кодирует рецептор прогестерона. Кодированный белок опосредует физиологические эффекты прогестерона, который играет центральную роль в репродуктивных событиях, связанных с установлением и поддержанием беременности [91].

HER2 (рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2) – кодирует член семейства рецепторных тирозинкиназ рецептора эпидермального фактора роста (EGF). Амплификация и/или избыточная экспрессия этого гена были зарегистрированы при многочисленных раковых заболеваниях, включая опухоли молочной железы и яичников [26, 50, 67].

GRB7 (ген рецептор – связанного фактора роста 7) – кодирует белок, связывающий рецептор фактора роста, который взаимодействует с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) и рецепторами эфрина. Белок играет роль в сигнальном пути интегрин и миграции клеток путем связывания с киназой с фокальной адгезией (ФАК) [34, 73].

HMGB1 (ген экспрессии маммоглобина) – Кодирован белок маммоглобин, функции которого неизвестны, однако согласно литературным данным, его экспрессия повышена в высокодифференцированных опухолях [134, 137].

MMP11 (ген матричной металлопептидазы 11) – фермент, кодируемый этим геном, активируется внутриклеточно фурином в рамках конститутивного секреторного пути. Также в отличие от других MMP, этот фермент расщепляет ингибитор альфа-1-протеиназы, но слабо разрушает структурные белки внеклеточного матрикса, участвует в разрушении внеклеточного матрикса при нормальных физиологических процессах, таких как эмбриональное развитие, репродукция и ремоделирование тканей, а также при таких заболеваниях, как артрит и метастазирование [79, 167].

CTSL2 (ген, регулирующий активность катепсина L2) – кодирует цистеинпротеазу катепсин V, участвующую в презентации антигена в эпителиальных клетках коры тимуса человека, и предполагается участие протеазы в аутоиммунных реакциях [212].

CD68 (кластер дифференцировки 68) – кодирует трансмембранный гликопротеин, экспрессирующийся человеческими моноцитами и макрофагами ткани и являющийся членом семейства гликопротеинов, ассоциированных с лизосомальной/эндосомальной мембраной (LAMP) [46, 164].

Использование данной мультигенной панели позволяет оценить изменения генов, ответственных за ключевые процессы жизнедеятельности опухолевой клетки, а также дифференцировать злокачественные, доброкачественные и неизмененные (нормальные) ткани молочной железы. Нами было предположено, что использование данной панели поможет провести верификацию молекулярного подтипа РМЖ. Проведение дальнейших исследований с включением данной модели позволит увеличить точность и специфичность типирования рака молочной железы, что послужит источником дополнительной информации в отношении прогноза заболевания и планируемой тактики системного лечения у данной категории пациенток.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В проспективное исследование было включено 358 больных раком молочной железы, (T₁₋₃N₀₋₃M₀), получивших лечение на базе ФГБУ «Российский Научный Центр Рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации в период с 2015 по 2017 годы. У всех больных проводился молекулярно-генетический анализ операционного материала с исследованием основного опухолевого узла. Также у 64 пациенток был проведен анализ удаленных аксиллярных лимфатических узлов с морфологически подтвержденным наличием метастазов. Исследование было проведено при соблюдении добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ № 2288 от 24.12.1993).

2.1 Общая характеристика клинического материала

При проведении исследования преобладали пациентки 50 лет и старше – 308 (86%) и находящиеся в состоянии менопаузы – 277 (77%). Средний возраст больных составил 61,22±10,4 лет (от 34 до 81 лет).

По результатам гистологического исследования опухоли молочной железы были представлены инвазивной карциномой неспецифического типа – 174 (48,6%); дольковым раком – 78 (21,8%); смешанным (дольково-

протоковый) раком – 77 (21,5%; а также редкими формами – 29 (8,1%). У 38 (10,6%) больных была установлена I степень злокачественности опухоли, у 218 (60,9%) – II степень злокачественности и у 102 (28,5%) пациенток – III степень злокачественности (таблица 7).

Таблица 7 – Распределение больных раком молочной железы в зависимости от возраста, состояние менструальной функции, гистологического типа опухоли и степени ее злокачественности

<i>Критерий оценки</i>	<i>Количество больных</i>	
	<i>абс. ч.</i>	<i>%</i>
Возраст больной		
• моложе 50 лет	50	14,1
• 50 лет и старше	308	85,9
Всего	358	100
Средний возраст	61,22 ±10,4 лет	
Состояние менструальной функции		
сохранена	95	26,5
менопауза	291	83,5
Всего	358	100
Гистологический тип опухоли		
• Инвазивная карцинома неспецифического типа	174	48,6
• Дольковый рак	78	21,8
• Смешанный (протоковый-дольковый)	77	21,5
	29	8,1

• Редкие формы		
Всего	358	100
Степень злокачественности		
I	38	10,6
II	218	60,9
III	102	28,5
Всего	358	100

В исследовании преобладали больные с метастазами в лимфатические узлы – 194 (54,2) и со ПА стадией опухолевого процесса – 127 (35,5%) (таблица 8).

Таблица 8 – Состояние регионарных лимфатических узлов и стадия опухолевого процесса у больных РМЖ

Критерий оценки	Количество больных	
	абс. ч.	%
Состояние лимфатических узлов		
• N0		
• N1	164	45,8
• N2	84	23,5
• N3	79	22,1
	31	8,6
Всего	358	100
Стадия опухолевого процесса		
• I (T1N0M0)	76	21,2
• ПА (T1-2N0-1M0)	127	35,5
• ПВ (T2-3N0-1M0)	63	17,6
• ША (T1-4N0-3M0)	18	5,0
	52	14,5

<ul style="list-style-type: none"> • ШВ (Т1-4N0-3M0) • ШС (Т1-4N0-3M0) 	22	6,1
Всего	358	100

Всем больным выполнялся хирургический этап лечения в объеме радикальной мастэктомии 175 пациенткам (49%), органсохраняющих операций – 121 (34%), а также подкожной мастэктомии, аксиллярной лимфаденэктомией с одномоментной реконструкцией молочной железы – 62 (17%).

В адъювантном режиме пациенткам РМЖ по показаниям проводились курсы химиотерапии, гормональная и таргетная терапия, а также лучевая терапия.

2.2 Методы исследования

На этапе диагностики всем пациенткам проводилось полное клинико-рентгенологическое обследование, которое включало клинический осмотр, общеклинические анализы, рентгенографию, маммографию, УЗИ молочных желез, зон регионарного лимфооттока, печени. Дополнительные методы диагностики (магнитно-резонансная томография головного мозга, компьютерная томография органов грудной клетки и остеосцинтиграфия) выполнялись по показаниям. Стадирование опухолевого процесса осуществлялось согласно международной классификации по системе TNM (2009).

Морфологическое и иммуногистохимическое исследования. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование выполнялись по стандартной методике в патологоанатомическом отделении ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России с учением биопсийного и операционного материалов ткани первичного опухолевого узла, а также всех удаленных лимфатических узлов. Диагноз РМЖ устанавливался согласно «Гистологической классификации

опухолей молочной железы» (ВОЗ, 2012). Степень злокачественности опухоли определялась в соответствие с критериями Elston-Ellis.

Иммуногистохимическим методом изучалась экспрессия рецепторов эстрогена (антитела PA0151, клон 6F11, Leica Microsystems), прогестерона (PA0312, клон 16, Leica Microsystems), рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu (антитела A0485, Dako, Дания) и маркера клеточной пролиферации Ki67 (антитела PA0118, клон MM1, Leica Microsystems).

Оценка экспрессии рецепторов к половым гормонам проводилась полуколичественным способом по D.C. Allred et al. – подсчету подвергалась только ядерная реакция (таблица 9). Положительная экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона оценивалась при суммарном количестве баллов более 3 (>3).

Таблица 9 – Полуколичественная оценка иммуногистохимического определения рецепторов стероидных гормонов (D.C. Allred et al., 1998)

<i>А. Доля положительно окрашенных клеток</i>	<i>Баллы</i>
0	0
>0 и <1/10	1
$\geq 1/10$ и $\leq 1/3$	2
$\geq 1/3$ и $\leq 1/100$	3
$\geq 1/100$ и $2/3$	4
$\geq 2/3$ и ≤ 1	5
<i>Б. Интенсивность окраски</i>	
Негативная	0
Слабая	1
Промежуточная	2
Сильная	3
<i>В. Общая оценка</i>	

Пролиферативная активность определялась в ядрах опухолевых клеток, экспрессирующих Ki67. Оценка экспрессии рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu выполнялась согласно рекомендациям Wolff et.al. с помощью иммуногистохимического метода с учетом только инвазивного компонента опухоли: негативными считались случаи с отсутствием окрашивания или со слабым, прерывистым мембранным окрашиванием (категории 0 и 1+), положительными – случаи с сильным окрашиванием всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток (категории 3+) (таблица 10).

Таблица 10 – Критерии оценки интенсивности и типа иммунного окрашивания мембраны опухолевых клеток рака молочной железы

<i>Характер окрашивания</i>	<i>Оценка в баллах</i>	<i>Оценка Her2 статуса</i>
Отсутствие мембранного окрашивания или наличие слабого окрашивания менее 10% опухолевых клеток	0	Негативный
Слабое мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток	1	Негативный
Умеренное мембранное окрашивание более 10% опухолевых клеток или сильное мембранное окрашивание менее 10% опухолевых клеток	2	Неопределенный
Сильное полное окрашивание мембран более 30% опухолевых клеток	3	Позитивный

При слабом до умеренного окрашивания всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток (категории 2+) всем пациенткам проводился FISH-анализ (флуорисцентная гибридизация in situ) по стандартной методике. Положительными считались результаты теста при соотношении

среднего количества копий гена *Her2/neu* и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке более 2,2.

По результатам иммуногистохимического анализа выполнялось распределение больных РМЖ на молекулярно-биологические подтипы согласно рекомендациям RUSSCO от 2019 года (таблица 11).

Таблица 11 – Молекулярно-биологические подтипы рака молочной железы по рекомендациям RUSSCO от 2019 года

Молекулярно-биологический подтип	Клинико-патологическое (суррогатное) определение подтипа
Люминальный А	<p><i>Наличие всех факторов:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • РЭ положительный • РП высокий (> 20%) • Her2/neu отрицательный • Ki-67 низкий (< 20%)
Люминальный В (Her2 отрицательный)	<ul style="list-style-type: none"> • РЭ положительный • Her2/neu отрицательный <p><i>и наличие одного из следующих факторов:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • РП низкий (< 20%) • Ki-67 высокий (> 30%)
Люминальный В (Her2 положительный)	<ul style="list-style-type: none"> • РЭ положительный • Her2/neu положительный • РП любые • Ki-67 любой
Her2-позитивны	<ul style="list-style-type: none"> • Her2/neu положительный

(не люминальный)	• РЭ и РП отрицательные
Базальноподобный рак	• РЭ, РП, Her2/neu отрицательные (тройной негативный протоковый)

Молекулярно-генетическое исследование с использованием методов ПЦР выполнялось в научно-исследовательском отделе молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России. У всех пациенток изучался операционный материал основного опухолевого узла (n=358) и метастатических лимфатических узлов (n=64).

Исследование свежеполученного опухолевого материала проводилось в несколько этапов: выделение мРНК из полученной ткани, реакция ОТ-ПЦР и непосредственно проведение РВ-ПЦР. При выделении РНК применялись наборы RNeasy (Qiagen, USA), анализ полученных данных выполнялся по инструкциям, предоставленным производителем. Для проведения реакции ОТ-ПЦР и РВ-ПЦР использовали наборы «ЗАО НПФ ДНК-Технология» также согласно протоколу производителя. В качестве контроля за качеством проведения исследования дополнительно проводилось изучение образцов ткани без проведения предварительной обратной транскрипции. Для определения амплификации генов применялись приборы «ДТ-322» и «ДТ-964» фирмы «ЗАО НПФ ДНК-Технология».

Определение уровня экспрессии мРНК (относительные единицы) выполнялось с по методике, описанной ранее, с использованием 3 генов-хаускипингов. Применяемая в данном анализе панель генов включала оценку экспрессии 21 генов (*Ki67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68*) и 3 контрольных генов (*GUSB, HPRT1, B2M*). Распределение генов на функциональные группы с оценкой основных биологических характеристик опухолевых клеток представлено в таблице 12.

Таблица 12 – Функциональные группы исследуемых генов

<i>Функциональные группы</i>	<i>Исследуемые гены</i>
Контроль пролиферации	KI67, CCND1, MYC, P16 ^{ink4A} , PTEN, MYBL2, STK15, CCNB1
Контроль апоптоза	BIRC5, TERT, BCL2, BAG1, NDRG1
Клеточная дифференцировка/рецепторы	ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1
Клеточная адгезия	MMP11, CTSL2
Маркер активированных макрофагов	CD68
Контрольные гены	B2M, GUSB, HPRT1

2.3 Статистические методы обработки материала

В данном исследовании статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием пакета программ Statistica 10.0.4. для Windows. Применялись стандартные методы описательной, параметрической и непараметрической статистики, а также многомерный статистический анализ, включающий факторный, линейный, кластерный и дискриминационный анализ полученных данных. Данные были проверены на нормальное распределение. Полученные данные были логарифмированы, что позволило использовать параметрические критерии для нормального распределения в группах. Если полученные значения распределения отличались от нормального, были использованы непараметрические статистические методы. Использование дискриминантного анализа позволило провести классификацию молекулярно-генетических подтипов.

Различие считалось достоверным при $p < 0,05$, т.е. в тех случаях, когда вероятность различия составляла больше 95%.

ГЛАВА 3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ ТКАНЕЙ ПЕРВИЧНОЙ ОПУХОЛИ И МЕТАСТАЗОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (Результаты исследования).

3.1. Сопоставление значений молекулярных маркеров у больных раком молочной железы, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР

3.1.1. Корреляция уровней экспрессии рецепторов эстрогена в основном опухолевом узле, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР

По результатам иммуногистохимического исследования больные раком молочной железы были распределены в зависимости от уровня экспрессии рецептора эстрогена в ткани основного опухолевого узла (таблица 13). По данным проведенных расчетов количество пациентов с отрицательным статусом рецептора эстрогена составило 76 (20,1%) случаев, положительным – 282 (79,9%). В подгруппе с РЭ-позитивными опухолями преобладали больные со значениями 7 и более баллов – 226 (62,6%).

Проводился анализ значений экспрессии рецептора эстрогена с применением метода ОТ-ПЦР по указанной выше методике с использованием средних значений. На рисунке 1 представлена гистограмма логарифма для всех исследуемых образцов ткани опухоли МЖ, которая демонстрирует широкий диапазон значений экспрессии РЭ в пределах от 0 до несколько тысяч условных единиц. Из представленного ниже очевидно, что характер полученных с помощью метода ОТ-ПЦР значений существенно отличается от результатов иммуногистохимического исследования с максимальными значениями в интервале от 5 до 8 условных единиц. Также обращает на себя внимание 2 пика экспрессии, которые можно отнести к РЭ-позитивным опухолям (уровень ESR1 больше 4) и РЭ-отрицательным опухолям (значение менее 4) (значение 4 было принято нами в качестве условной границы для разделения РЭ+ и РЭ-опухолей).

Таблица 13 – Распределение уровня экспрессии рецептора эстрогена у больных раком молочной железы, определяемого с помощью метода ИГХ

<i>Баллы</i>	<i>Абс.ч.</i>	<i>%</i>
0-1	57	15,3
1	13	3,3
2	6	1,5
3	5	1
4	8	2
5	11	3
6	42	11,4
7	67	18,6
8	79	22
9-10	80	22
Всего	358	100

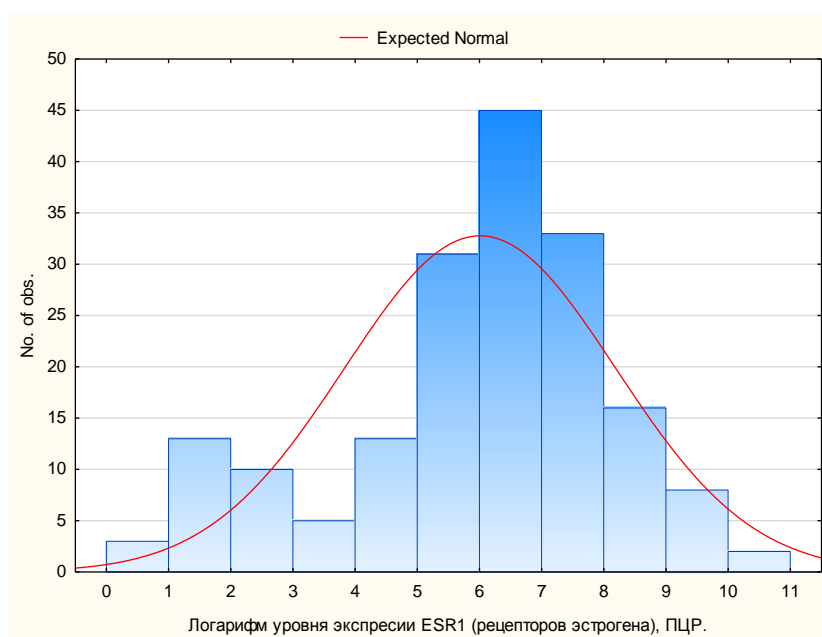


Рисунок 1 – Распределение уровня экспрессии рецептора эстрогена у больных раком молочной железы, определяемого методом ОТ-ПЦР

На следующем этапе нами была исследована группа образцов опухолевой ткани, которая по данным ИГХ-исследования характеризовалась отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена (нулевая экспрессия). Как видно из гистограммы, представленной на рисунке 2, средний уровень экспрессии в этой группе был достоверно ниже, чем в среднем по образцам, однако «ненулевой» уровень определялся в большем количестве случаев. При этом в подгруппе с экспрессией РЭ 0 баллов по данным ИГХ, уровень экспрессии более 4 по данным ПЦР («положительный» статус) составил 15%, что практически совпадает с данными клинических оценок по положительному ответу на гормональную терапию для РЭ отрицательных пациентов.

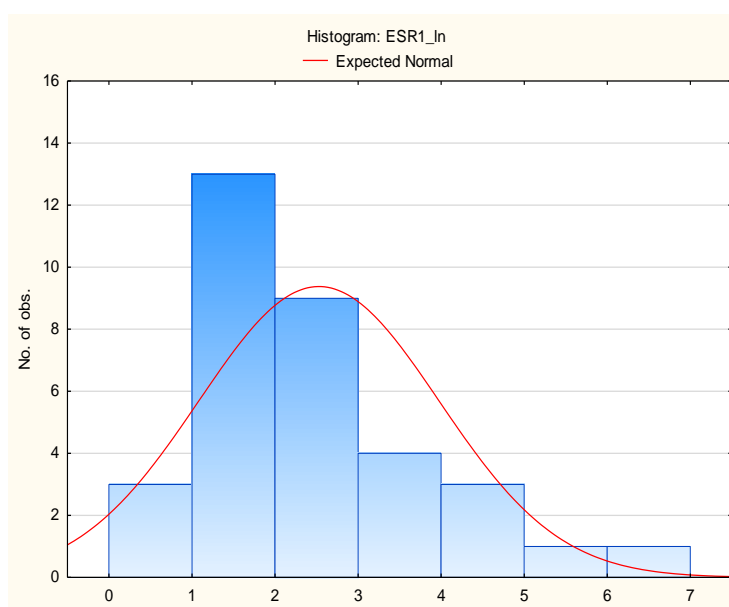


Рисунок 2 – Гистограмма значений уровня экспрессии мРНК в случаях с отрицательным статусом рецепторов эстрогена, выявленного с помощью ИГХ-исследования

Проводился корреляционный анализ экспрессии рецепторов эстрогена, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР, который продемонстрировал, что коэффициент корреляции между уровнем экспрессии эстрогеновых рецепторов, диагностированных методом ПЦР (не логарифмированная величина) и ИГХ, не высокий – 0,23. В тоже время, коэффициент корреляции между логарифмом

уровня экспрессии (метод ПЦР) и уровнем экспрессии (методом ИГХ) составляет 0,7765, что считается высокой корреляцией (таблица 14). Гистограммы распределения представлены на рисунке 3.

Таблица 14 – Коэффициенты корреляции между уровнями экспрессии эстрогеновых рецепторов, определяемых методами ИГХ и ПЦР

Показатель	<i>ESR1_In</i>	<i>ESR1</i>
ИГХ рецепторов эстрогена в опухоли	0,776577	0,227312

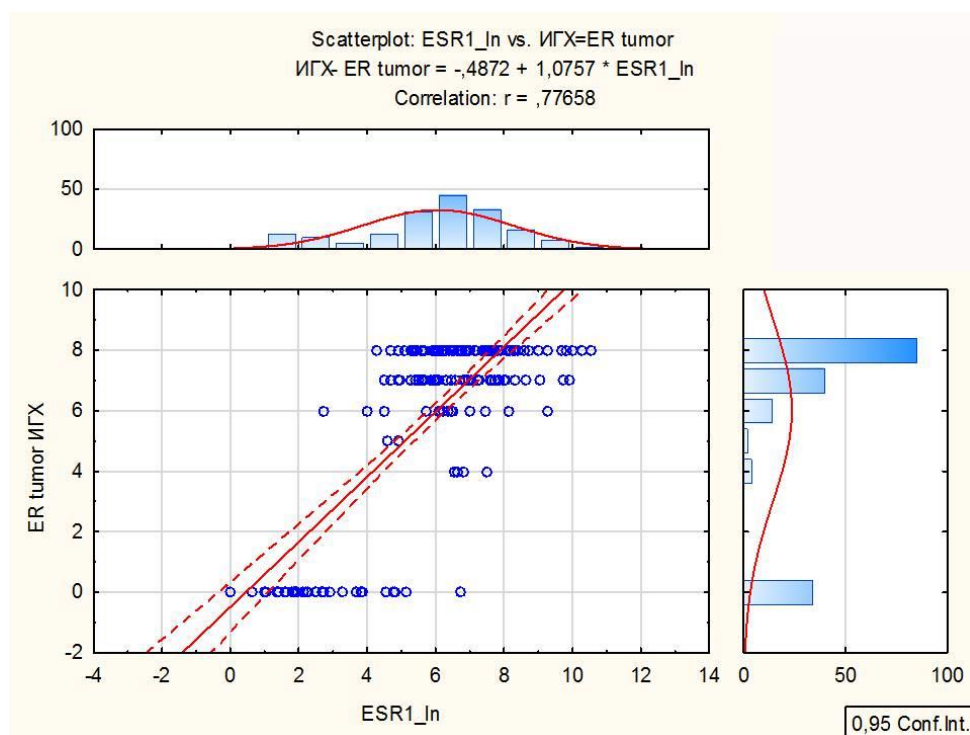


Рисунок 3 – Корреляция уровней экспрессии рецепторов эстрогена, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР у больных раком молочной железы

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют об ограничении возможностей диагностики экспрессии рецепторов эстрогена с применением иммуногистохимического исследования у группы больных раком

молочной железы с уровнем менее 4 баллов, тогда как результаты определения методом ПЦР имеют более равномерное распределение во всем исследованном диапазоне.

3.1.2. Корреляция уровней экспрессии рецепторов прогестерона в основном опухолевом узле, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР

По данным ИГХ-исследования операционного материала количество случаев с отрицательной экспрессией РП составило 127 (35,5%), с положительной – 231 (64,5%) (таблица 15). При этом, наибольшее количество положительных случаев приходилось на экспрессию рецепторов прогестерона в 8 и 9 баллов (17,6 и 18,7% соответственно).

Таблица 15 – Распределение уровня экспрессии рецептора прогестерона у больных раком молочной железы, определяемого с помощью метода ИГХ

Баллы	Абс.ч.	%
0	58	16,2
1	55	15,4
2	14	3,9
3	17	4,7
4	13	3,6
5	19	5,3
6	30	8,4
7	22	6,1
8	63	17,6
9	67	18,7
Всего	358	100

Гистограмма уровней экспрессии рецепторов прогестерона, определяемых методом ОТ-ПЦР, представлена на рисунке 4. Приведенные данные показывают, что практически для всех РП-отрицательных опухолей, выявленных методом ИГХ, обнаруживаются «ненулевые» уровни экспрессии маркера при проведении ПЦР-исследования.

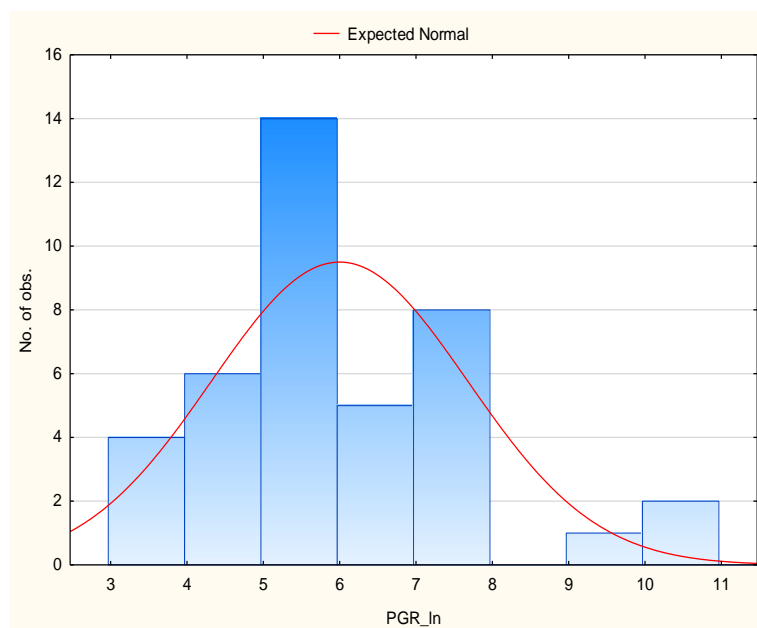


Рисунок 4 – Гистограмма значений уровня экспрессии мРНК рецепторов прогестерона, определяемого методом ОТ-ПЦР

Корреляционный анализ экспрессии рецептора прогестерона, выявленного методами ИГХ и ОТ-ПЦР, также продемонстрировал схожие закономерности, что и при изучении уровня экспрессии эстрогена. В тоже время, обращает на себя внимание отсутствие «провала» в регистрации уровней экспрессии рецептора прогестерона, определяемых методом ИГХ в диапазоне значений 2-4. Результаты корреляционного анализа представлены в таблице 16 и на рисунке 5.

Таблица 16 – Коэффициенты корреляции между уровнями экспрессии рецепторов прогестерона, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР

Показатель	<i>PGR</i>	<i>PGR_{ln}</i>
ИГХ рецептора	0,371946	0,713530

прогестерона в опухоли		
---------------------------	--	--

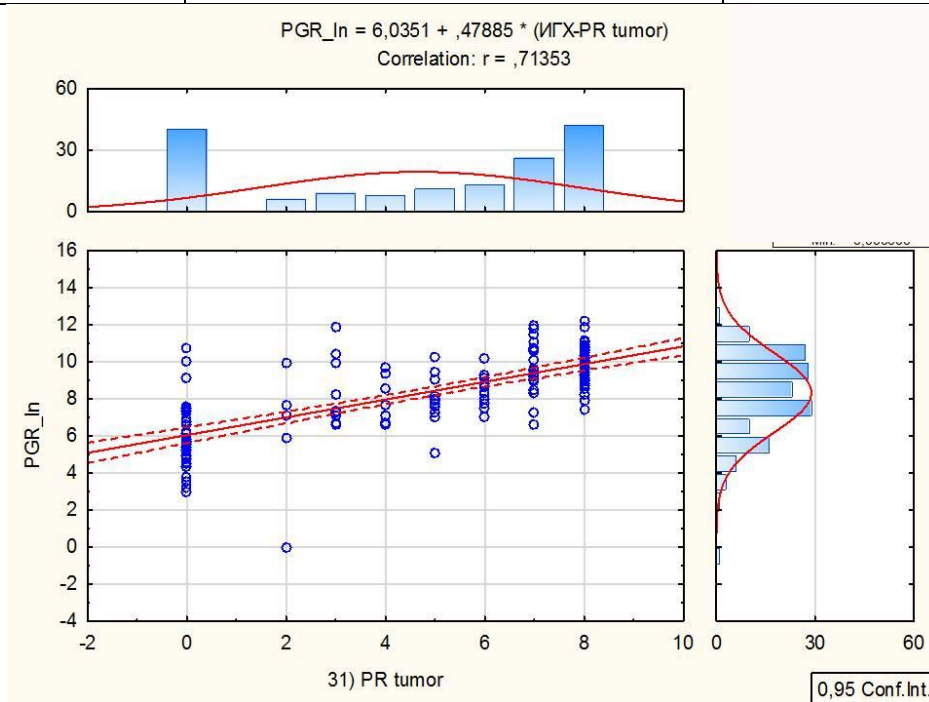


Рисунок 5 – Корреляция уровней экспрессии рецепторов прогестерона, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР у больных раком молочной железы

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о необходимости проведения дополнительных молекулярно-генетических исследований у пациентов РМЖ с отрицательным статусом рецепторов прогестерона, выявленного по данным ИГХ.

3.1.3. Корреляция уровня эпидермального фактора роста Her2/neu в основном опухолевом узле, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР

По результатам иммуногистохимического исследования гиперэкспрессия эпидермального фактора роста Her2/neu (показатели 2+ и 3+) была выявлена у 109 пациентов (30,4% больных), в то время как отрицательный статус маркера (0 и 1+) обнаруживался у 249 пациентов (69,6%) (таблица 17).

Таблица 17 – Распределение уровня экспрессии рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu у больных раком молочной железы, определяемого с помощью метода ИГХ

Значение Her2/neu	Абс.ч.	%
0	103	28,8
1	146	40,8
2	52	14,5
3	57	15,9
Всего	358	100,0

При изучении группы образцов опухолевой ткани, у которых на основании данных ИГХ статус Her2/neu определялся как «позитивный» (2+ и 3+), было выявлено, что при проведении ОТ-ПЦР практически отсутствуют образцы с низким уровнем экспрессии (если дифференцирующий уровень выбрать равным 4, по аналогии с рецепторами эстрогена и прогестерона) (рисунок 6).

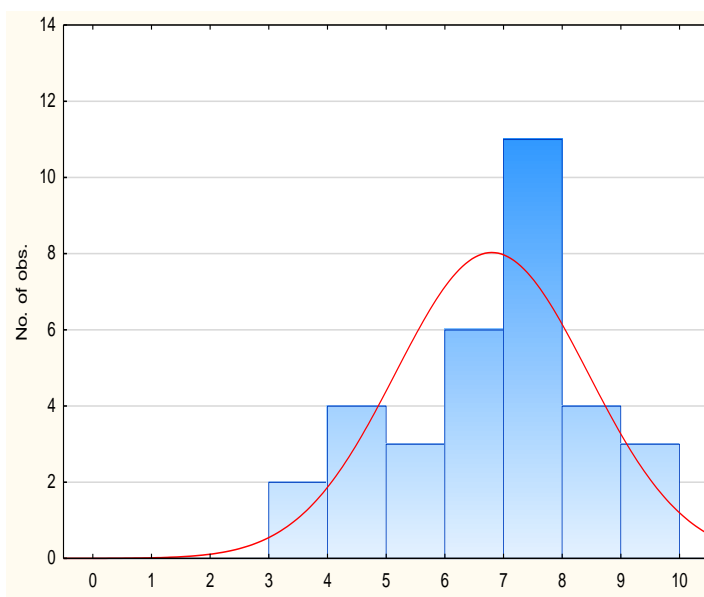


Рисунок 6 – Гистограмма значений уровня экспрессии мРНКHer2/neu, определяемых по данным ИГХ как «позитивные»

При анализе образцов, у которых по данным ИГХ статус Her2 был определен как «отрицательный» (0 и 1+), напротив, более половины имели высокие значения экспрессии мРНК Her2/neu (рисунок 7).

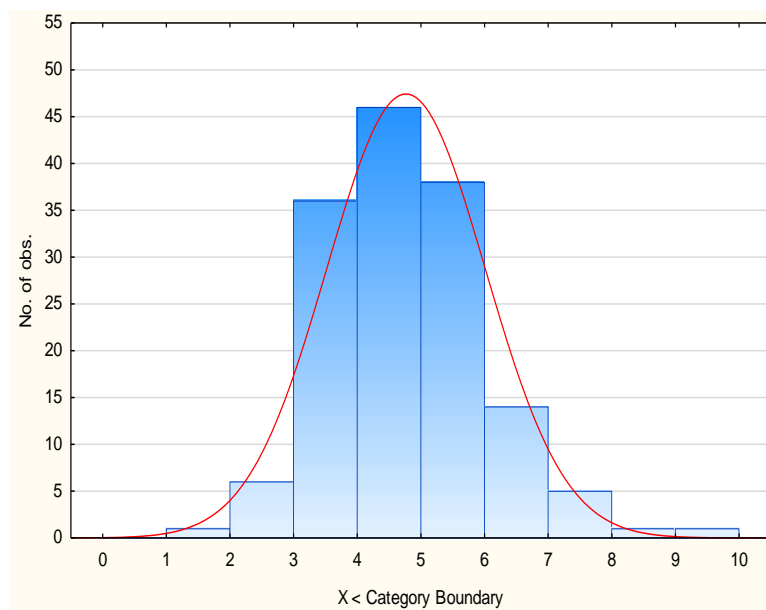


Рисунок 7 – Гистограмма значений уровня экспрессии мРНКHer2/neu, определяемых по данным ИГХ как «негативные»

Проведенный корреляционный анализ продемонстрировал высокое соотношение результатов ИГХ исследования и метода ОТ-ПЦР. Результаты представлены в таблице 18 и на рисунке 8.

Таблица 18 – Коэффициенты корреляции между экспрессией рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu, определяемого методами ИГХ и ОТ-ПЦР

Показатель	<i>Her2</i>	<i>Her2_ln</i>
ИГХ Her2/neu в опухоли	0,443	0,532

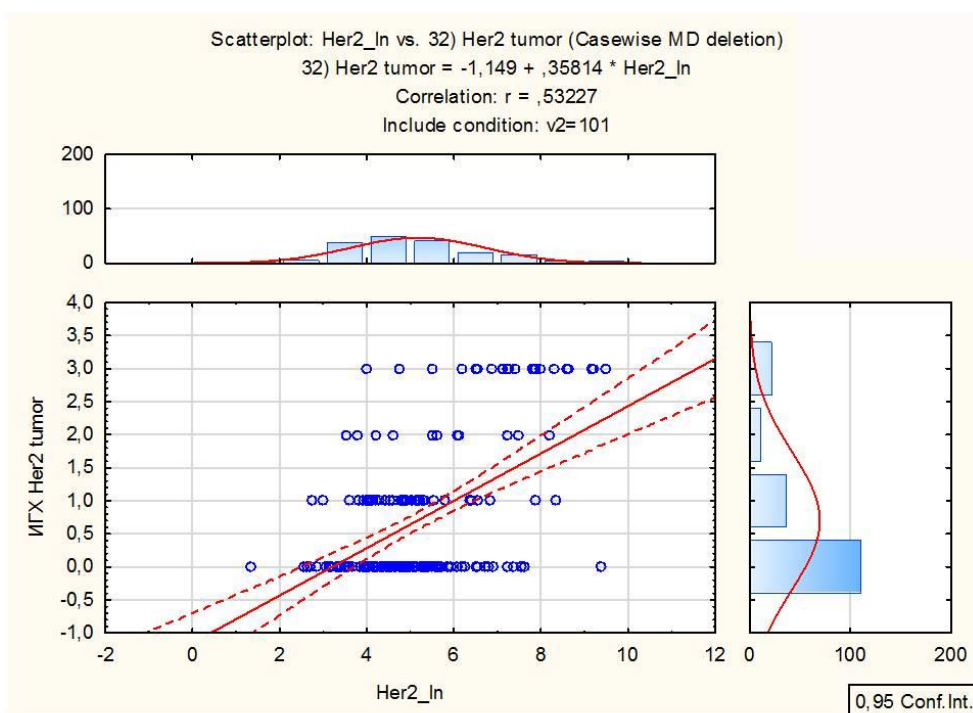


Рисунок 8 – Корреляция уровня экспрессии рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu, определяемого методами ИГХ и ОТ-ПЦР у больных раком молочной железы

Таким образом, при изучении данных по экспрессии Her2/neu, полученных методами ИГХ и ОТ-ПЦР, была выявлена необходимость проведения дополнительных молекулярно-генетических исследований у группы пациентов с экспрессией изучаемого параметра, равного 0 и 1+. Т.е часть образцов, получивших заключение как «Her2 отрицательные» могут экспрессировать этот рецептор на достаточном уровне для проведения соответствующей таргетной терапии. Эти результаты еще раз подчеркивают необходимость включения дополнительных методов анализа уровней экспрессии клинически значимых рецепторов для оправданного назначения специфической противоопухолевой терапии.

3.1.4. Корреляция уровня маркера клеточной пролиферации Ki67 в основном опухолевом узле, определяемого методами ИГХ и ОТ-ПЦР

При проведении корреляционного анализа экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67 обращает на себя внимание тот факт, что в отличие от показателей экспрессии эстрогенов и прогестерона, для которых уровень корреляции для логарифмов значений был существенно выше, для Ki67 коэффициенты корреляции для абсолютного и логарифмированного показателя практически не отличались (таблица 19, рисунок 9).

Таблица 19 – Коэффициенты корреляции между экспрессией маркера клеточной пролиферации Ki67, определяемого методами ИГХ и ОТ-ПЦР

Показатель	<i>Ki67</i>	<i>Ki67_ln</i>
ИГХ Ki67 в опухоли	0,523	0,526

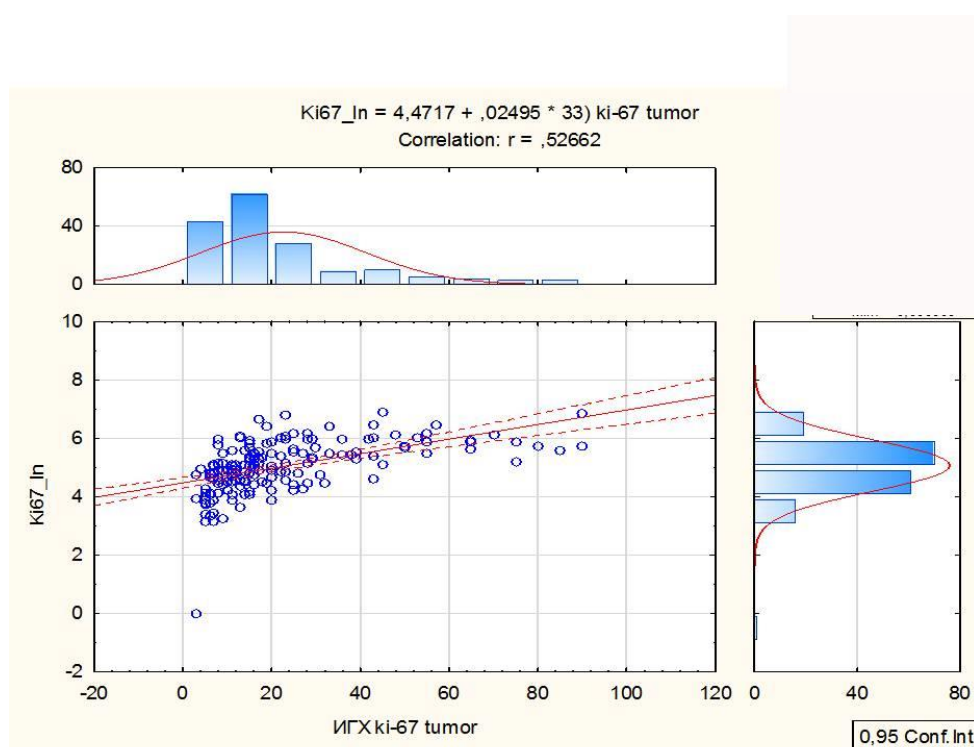


Рисунок 9 – Корреляция экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67, определяемого методами ИГХ и ОТ-ПЦР у больных раком молочной железы

При проведении линейной корреляции между показателями нами было получено уравнение регрессии, что позволяет вычислить уровень экспрессии Ki67, определенный методом ПЦР для дифференциации Люминального А и В фенотипов: $Ki67 = 100,22 + 4,9141 \times (\text{ИГХ Ki-67 опухоль})$

Например, если принять за дискриминирующий уровень величину 17%, то уровень Ki67, определяемый методом ПЦР будет равен: $Ki67 = 100,22 + 4,9141 * (\text{ИГХ Ki67опухоль} = 17) = 183,8$.

Таким образом, высокий разброс экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67, регистрируемых методами ОТ-ПЦР и ИГХ, еще раз подчеркивает проблему разграничения Люминальных А и В фенотипов, а также проблему диагностики высокопролиферирующих опухолей с учетом только одного показателя, что несомненно диктует необходимость использования нескольких молекулярно-генетических характеристик, отражающих пролиферацию опухолевых клеток.

3.2. Молекулярное типирование рака молочной железы по результатам ИГХ и ОТ-ПЦР исследований

По результатам проведенного иммуногистохимического анализа осуществлялось молекулярное типирование злокачественных опухолей молочной железы с выделением 5 подтипов. Люминальный тип А был выявлен у 129 (36%) больных; люминальный В (Her2-негативный) у 110 (30,7%); люминальный В (Her2-позитивный) у 49 (13,7%); трижды негативный у 54 (15,1%); Her2-позитивный 16 (4,5%) (таблица 20).

Таблица 20 – Распределение больных раком молочной железы на молекулярные подтипы на основании данных ИГХ исследования

<i>Критерий оценки</i>	<i>Количество больных</i>	
	<i>абс. ч.</i>	<i>%</i>
Люминальный тип А	129	36,0
Люминальный В (Her2-негативный)	110	30,7
Люминальный В (Her2-позитивный)	49	13,7
Her2-позитивный рак	16	4,5
Трижды негативный рак	54	15,1
Всего	358	100

Учитывая тот факт, что использование традиционной иммуногистохимической модели не в полной мере отражает точность разделения на молекулярно-биологические подтипы у больных раком молочной железы, нами была проанализирована возможность применения панели, состоящей из 24 генов (*Ki67, STK-15, CCNB1, CCND1, MYC, MYBL2, P16INK4A, PTEN, BIRC5, BCL2, BAG1, TERT, NDRG1, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11, CTSL2, CD68, GUSB, HPRT1, B2M*), определяемых методом ОТ-ПЦР. В отличие от предыдущих исследований оно имело проспективный характер и включало репрезентативный анализ послеоперационного материала. В связи с этим на этапе подготовки параллельно с нарезкой образцов опухолевой ткани для морфологического и иммуногистохимического исследований готовились срезы для проведения комплекса реакций ОТ-ПЦР.

На первом этапе статистической обработки нами применялся кластерный анализ методом К-средних, проводящий группировку образцов по степени их схожести на основании измеренных уровней экспрессии 24 генов. Результаты – средние значения центров групп для 5 выделенных кластеров представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты кластерного анализа (метод К-средних) по распределению образцов на 5 групп на основании анализа экспрессии 24 генов

Номер Группы	1	2	3	4	5
1	0,00000	5,64342	2,64256	2,42323	1,76574
2	2,23421	0,00000	4,06545	2,87632	4,16567
3	1,37232	2,02563	0,00000	1,54334	1,98234
4	1,48673	1,43567	1,23432	0,00000	1,34534
5	1,13345	2,00645	1,54232	1,32423	0,000000

Дополнительная проверка данных кластерного анализа результатами дискриминантного анализа показала высокие показатели точности распределения образцов опухолевой ткани к заданным ранее подгруппам (суммарный процент классификаций 93,8). Наиболее высокие показатели отмечались для групп 2 и 3 (95 и 100% соответственно); меньшие в подгруппе 4 (81%) (таблица 22).

Таблица 22 – Данные классификации на основании дискриминантного анализа по 24 исследованным генам, на 5 групп, образованных методом К-средних

Номер группы	%	G_1:1	G_2:2	G_3:3	G_4:4	G_5:5
1	88,6364	39	1	2	0	2
2	95,1220	0	39	1	0	1
3	100,0000	0	0	117	0	0
4	81,8182	0	0	4	36	4
5	93,4783	0	0	5	1	86
Всего	93,7870	39	40	129	37	93

Далее для каждой из выделенных групп было вычислено среднее значение уровня экспрессии анализируемых генов.

На рисунках 10-20 представлены результаты исследования ряда генов в зависимости от молекулярно-биологического фенотипа опухоли.

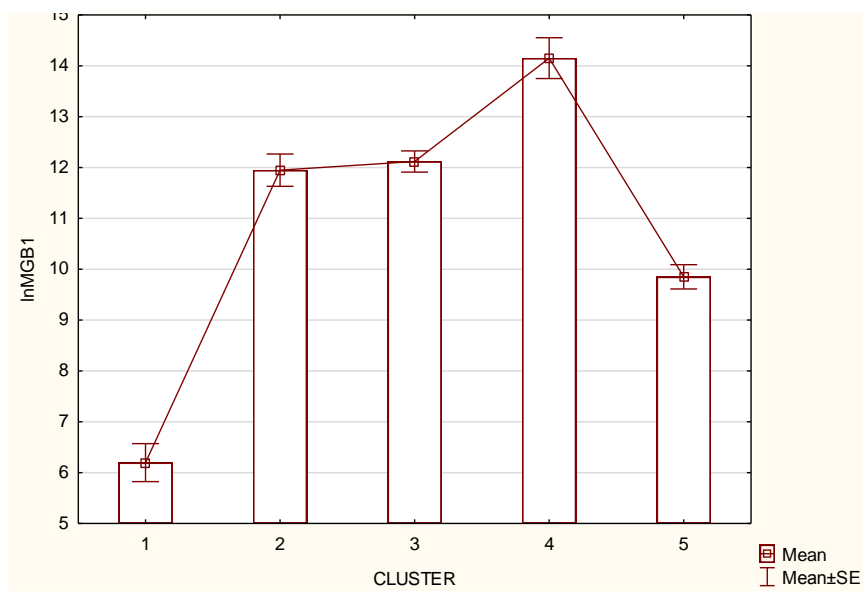


Рисунок 10 – Экспрессия гена MGB1 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

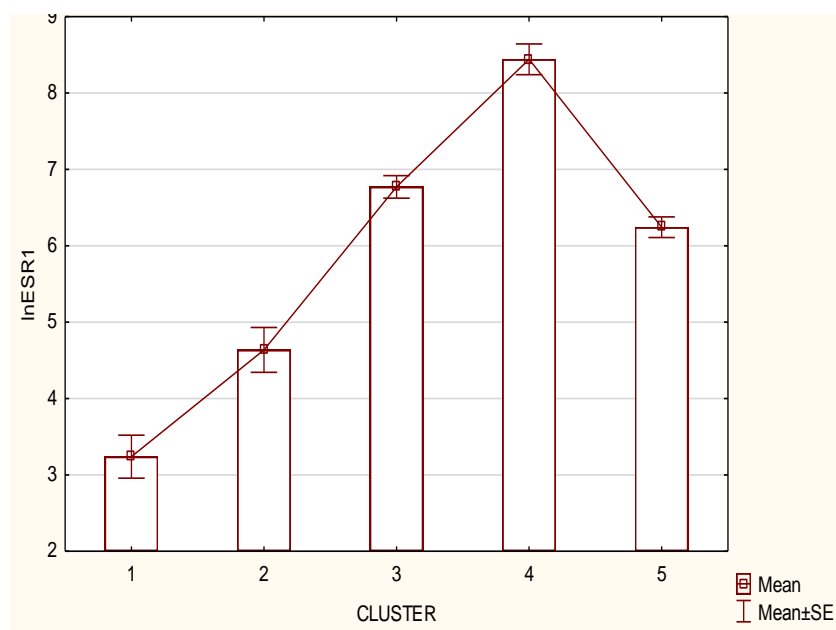


Рисунок 11 – Экспрессия гена ESR1 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

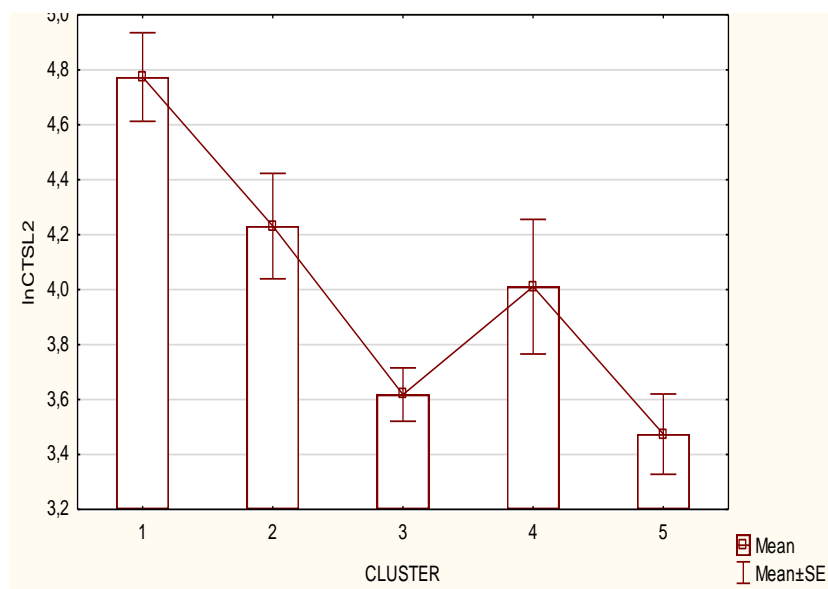


Рисунок 12 – Экспрессия гена CTSL2 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

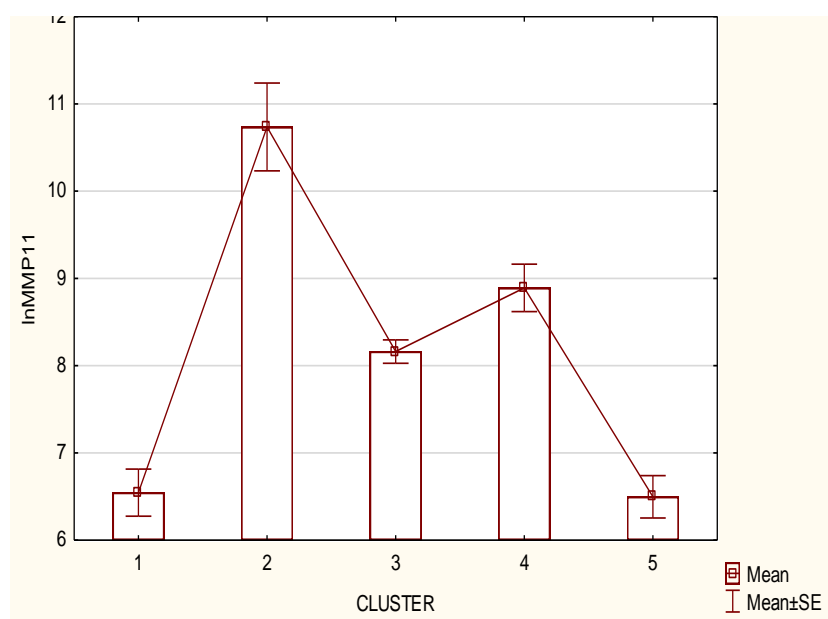


Рисунок 13 – Экспрессия гена MMP11 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

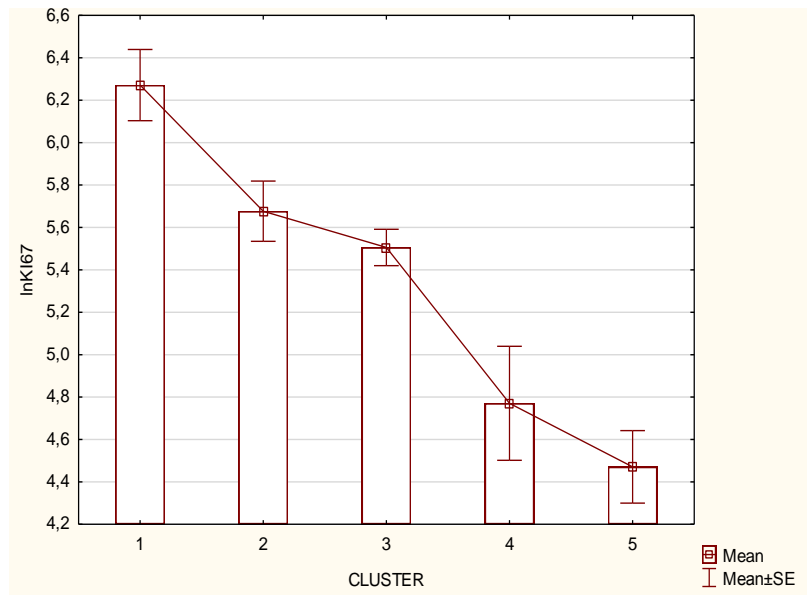


Рисунок 14 – Экспрессия гена Ki67 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

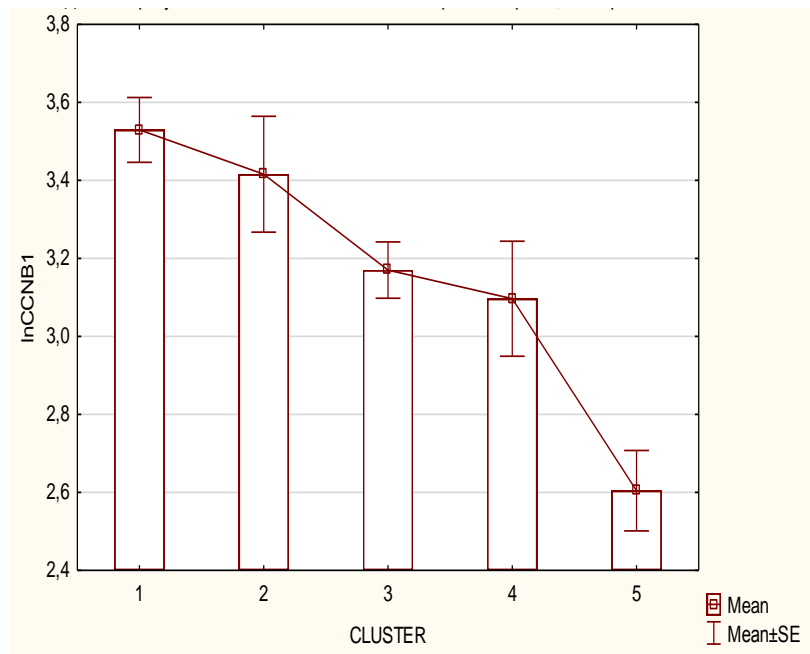


Рисунок 15 – Экспрессия гена CCNB1 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

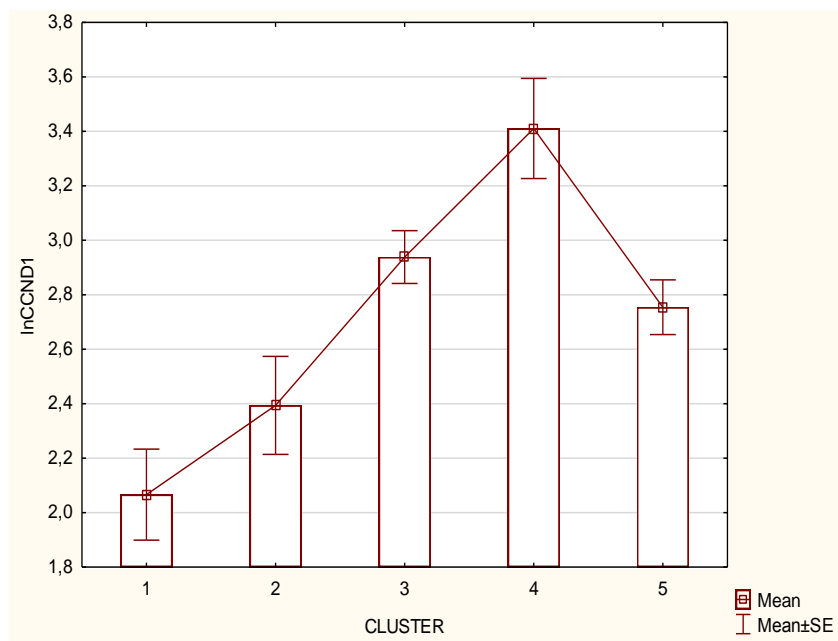


Рисунок 16 – Экспрессия гена CCND1 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

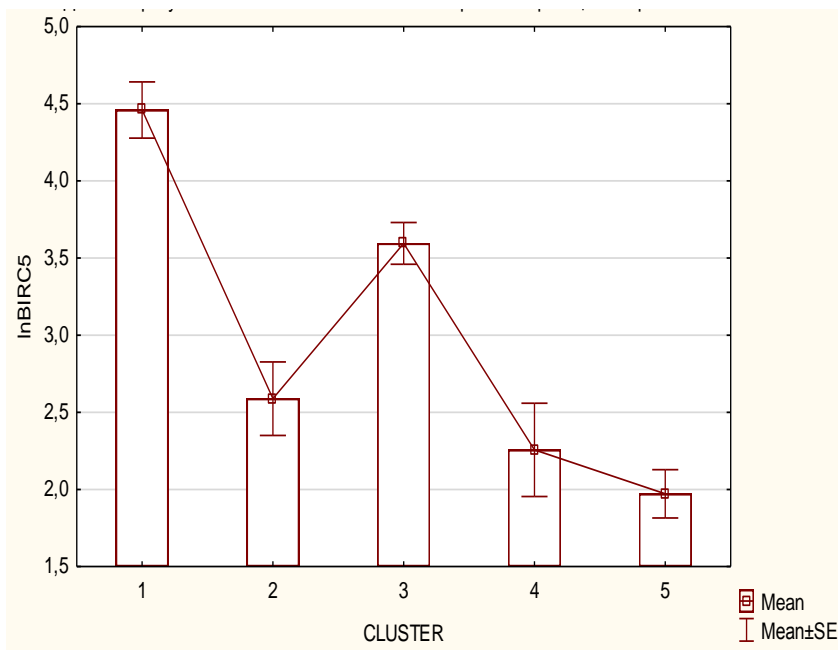


Рисунок 17 – Экспрессия гена BIRC5 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

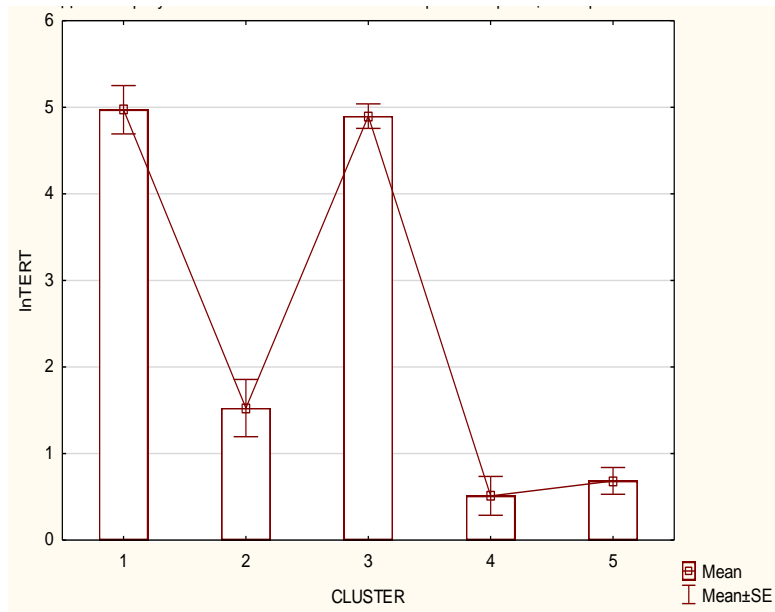


Рисунок 18 – Экспрессия гена TERT в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

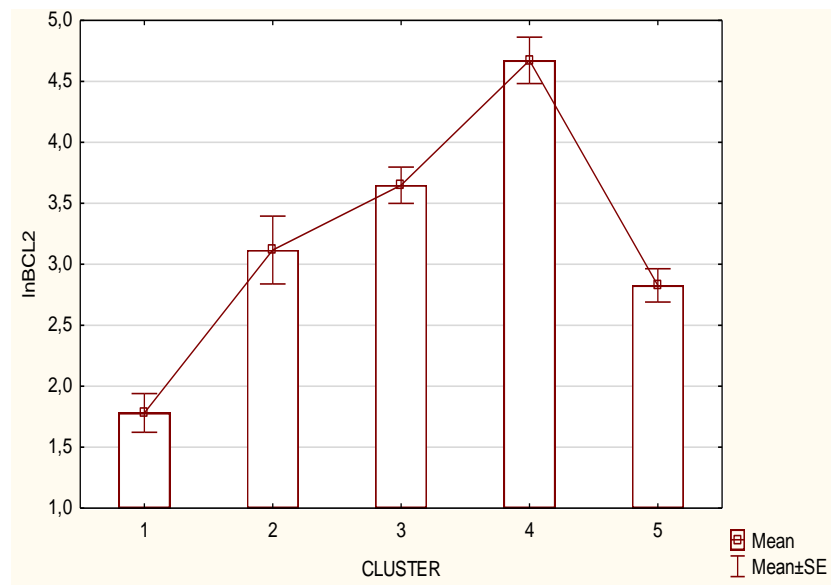


Рисунок 19 – Экспрессия гена BCL2 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

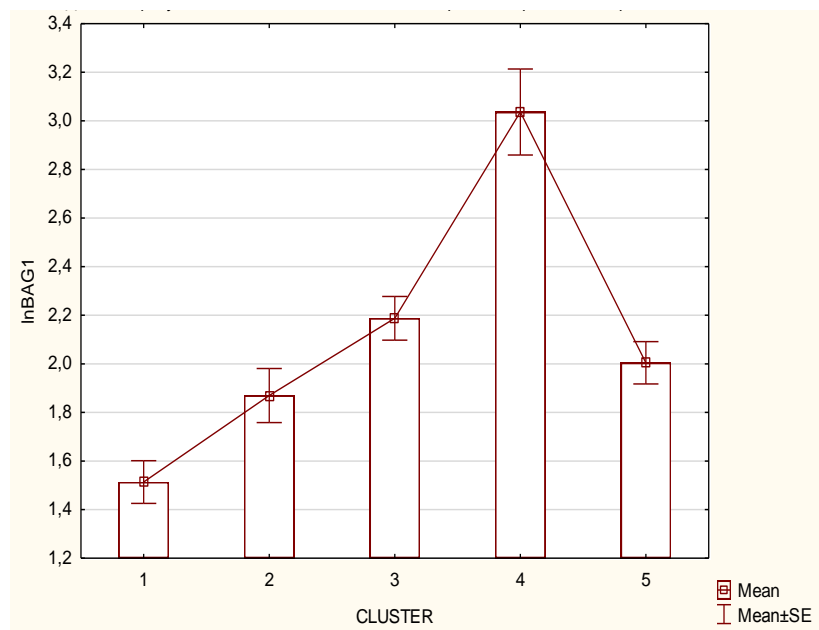


Рисунок 20 – Экспрессия гена BAG1 в зависимости от молекулярных подтипов у больных раком молочной железы

Принадлежность кластеров к классическим фенотипам можно определить по среднему уровню показателей экспрессии 4 генов (Ki67, ESR, PGR, Her2), используемых при определении фенотипа по ИГХ методу (рисунок 21).

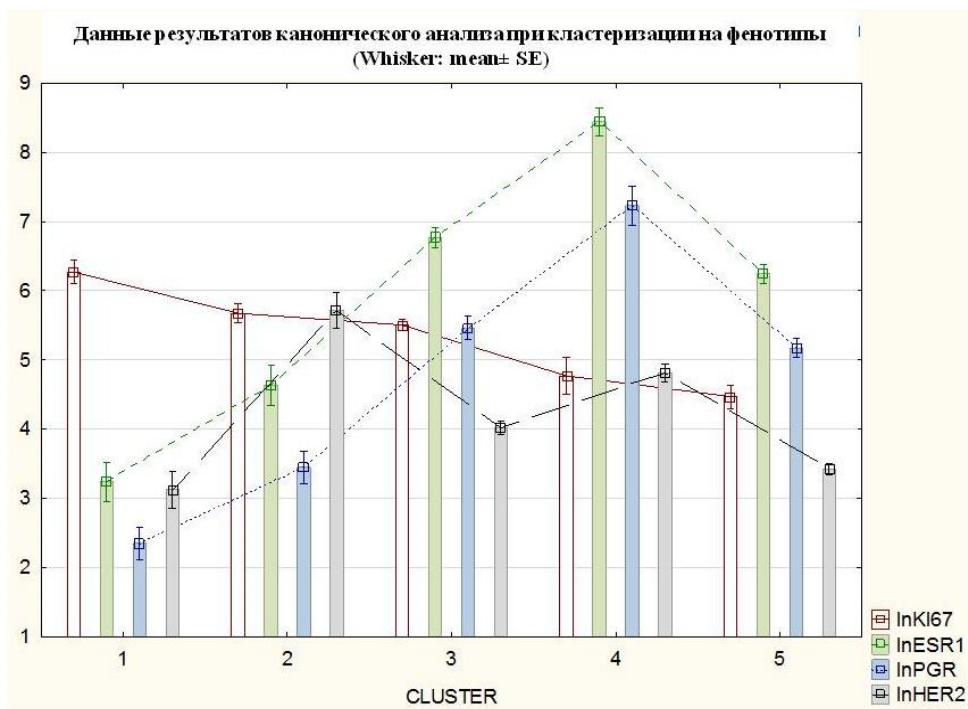


Рисунок 21 – Уровень экспрессии показателей Ki67, ESR, PGR, Her2 в 5 фенотипах опухоли, выделенных методом классификации К-средних у больных раком молочной железы

На основании анализа уровня экспрессии этих четырех генов можно провести следующую ассоциацию между номером класса и «классическим» молекулярным фенотипом.

№1 – трижды негативный,

№2 – Her2 позитивный,

№3 – Люминальный В Her2-позитивный,

№4 – Люминальный А,

№5 – Люминальный В Her2-негативный.

Например, номер 1 соотносится с тройным негативным фенотипом на основании минимальной экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестеронов и Her2neu и наиболее высокого уровня экспрессии Ki67. Номер 4 можно отнести к люминальному А фенотипу на основании максимального уровня экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестеронов и низкого уровня экспрессии Ki67. Номер 2 – к Her2-позитивному фенотипу – на основании максимального уровня экспрессии этого рецептора и высокого уровня экспрессии Ki67.

Мы также проанализировали вес (значимость) исследуемых генов для классификации. Значимость переменных в модели оценивалась на основании величины F-статистики. Чем выше значение этого показателя, тем больший вклад в классификацию он вносит. При анализе таблицы 23, обращает внимание, что Ki67 не вносил значимого вклада в дифференцирующую модель, а наибольший вклад вносили такие гены как BIRC5, ESR1, PGR, HER2, GRB7, MGB1, MMP11 и TERT, а также BCL2, MYBL2, MYC и STK15.

Таблица 23 – Данные с результатами канонического анализа при кластеризации на фенотипы методом дискриминантного анализа

N =358	Wilks' Lambda: ,03155 approx. F (84,1238) = 20,629 p<0,0000					
	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (4,313)	p-value	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
lnKI67	0,031768	0,993242	0,53240	0,712016	0,719036	0,280964
lnSTK15	0,032876	0,959749	3,28170	0,011776	0,608173	0,391827
lnCCNB1	0,031845	0,990830	0,72422	0,575933	0,627925	0,372075
lnCCND1	0,032451	0,972333	2,22659	0,066030	0,712822	0,287178
lnMYC	0,032753	0,963373	2,97501	0,019588	0,680500	0,319500
lnMYBL2	0,032649	0,966429	2,71816	0,029872	0,533874	0,466126
lnP16INK4a	0,032320	0,976276	1,90155	0,109995	0,850018	0,149982
lnPTEN	0,032377	0,974546	2,04377	0,088131	0,817666	0,182334
lnBIRC5	0,033576	0,939761	5,01582	0,000624	0,712487	0,287513
lnBCL2	0,032749	0,963477	2,96628	0,019873	0,689965	0,310036
lnBAG1	0,031809	0,991969	0,63355	0,638909	0,746579	0,253421
lnESR1	0,036973	0,853418	13,44018	0,000000	0,639076	0,360924
lnPGR	0,033729	0,935499	5,39517	0,000326	0,788054	0,211946
lnHER2	0,033807	0,933322	5,59031	0,000233	0,633044	0,366956
lnGRB7	0,034152	0,923911	6,44431	0,000054	0,749497	0,250503
lnMGB1	0,048828	0,646211	42,84053	0,000000	0,871980	0,128020
lnMMP11	0,039561	0,797583	19,85892	0,000000	0,818982	0,181018
lnCTSL2	0,031819	0,991652	0,65871	0,621137	0,716590	0,283410
lnCD68	0,032084	0,983451	1,31677	0,263558	0,766683	0,233317
lnTERT	0,070631	0,446735	96,90978	0,000000	0,927349	0,072651
lnNDRG1	0,032346	0,975502	1,96514	0,099653	0,862804	0,137196

Таким образом, наибольшую статистическую значимость в типировании рака молочной железы продемонстрировали гены STK15, MYC, MYBL2, BIRCC5, BCL2, TERT и MMP11.

3.3. Соотношение результатов типирования рака молочной железы, определяемых иммуногистохимическим и ОТ-ПЦР методами исследования

На основании проведенных исследований проводился сравнительный анализ результатов распределения рака молочной железы на подтипы, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР. Результаты сравнительной классификации приведены в Таблице 24.

Таблица 24 – Сопоставление результатов типирования рака молочной железы с использованием ИГХ и ОТ-ПЦР исследований

\	%	Люм А	Люм В Her2 негат	Люм В Her2 позит	Her2- поз	Трижды негативный
Люм А	65,1	75	29	4	0	0
Люм В Her2 нег	67,4	26	62	4	0	0
Люм В Her2 поз	62,1	10	12	36	0	0
Her2-поз	75	0	1	3	12	0
Трижды негативный	90,1	0	1	2	2	49
Всего	71,9	111	105	49	14	49

По данным приведенной выше таблицы суммарный процент совпадений составил 71,9%. Следует отметить, что наибольшие показатели соответствия

отмечались в подгруппе трижды негативного рака – 90,1%, а также Her2-положительного рака молочной железы – 75,0%, что вероятно обусловлено удовлетворительным определением низких уровней экспрессии Ki67, Her2neu и рецепторов гормонов методами ИГХ, а также проведением дополнительных методов диагностики (методы гибридизации *in situ*) в случаях сомнительной экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (2+) в случаях трижды негативного РМЖ. Следует также обратить внимание, что основные ошибки связаны с дискриминацией люминальных фенотипов, процент правильной классификации колебался в пределах 62,1-67,4%. Можно предположить, что полученные в данном случае низкие значения обусловлены недостаточной эффективностью и субъективизацией при проведении ИГХ исследований. Полученные результаты заслуживают особого внимания в связи с тем, что данные подтипы имеют разное клиническое течение, а также объем системного лечения, что, несомненно, требует применения дополнительных современных молекулярных методов.

3.4 Анализ молекулярного фенотипа в первичном опухолевом узле и пораженных регионарных лимфатических узлах

Результаты морфологического и иммуногистохимического исследований операционного материала с распределением больных в зависимости от молекулярного подтипа опухоли и вовлеченных в процесс регионарных лимфатических узлов представлены в таблице 25. По результатам исследования преобладали больные с люминальным А и Люминальным В Her2-негативным подтипами (46,8 и 23,4% соответственно).

Таблица 25 – Распределение молекулярного подтипа РМЖ в исследованных регионарных лимфатических узлах

<i>Молекулярный подтип</i>	<i>Всего (абс.ч/%)</i>
Люминальный А	30 (46,8%)
Люминальный В Her2-негативный	15 (23,4%)
Люминальный В Her2-позитивный	4 (6,3%)
Трижды негативный	11 (17,2%)
Her2-позитивный	4 (6,3%)
Всего	64 (100%)

Проведено исследование и сравнение молекулярных фенотипов основного опухолевого и пораженных регионарных лимфатических узлов, по результатам которого в 59% случаев молекулярный фенотип пораженного лимфоузла соответствовал фенотипу основной опухоли, однако в 40,6% случаев (26 из исследованных 64 лимфоузлов) молекулярный фенотип лимфоузла был отличен от первичной опухоли (таблица 26). Наиболее часто отмечались различия в Люминальных А и Люминальных В подтипах.

Таблица 26 – Сравнение молекулярных фенотипов при раке молочной железы, определенных методом ПЦР в первичной опухоли и в метастатических регионарных лимфоузлах

<i>Изменение фенотипа в метастазе</i>		
Всего проанализировано	64	100%
Увеличение злокачественности	19	29,7%
Снижение злокачественности	7	10,9%
Всего измененных фенотипов	26	40,6%

При этом, наблюдаемые варианты изменения фенотипов в метастатических лимфатических узлах были представлены:

- Основная опухоль (Люминальный А) – метастатический лимфоузел (Люминальный В Her2-отрицательный подтип) – 23,4% (56,1% от всех измененных фенотипов лимфоузлов);
- Основная опухоль (Люминальный В Her2-отрицательный) – метастатический лимфоузел (Трижды негативный) – 4,7% (12,2% от всех измененных фенотипов лимфоузлов);
- Основная опухоль (Люминальный В Her2-отрицательный) – метастатический лимфоузел (Люминальный А) – 6,25% (14,6% от всех измененных фенотипов лимфоузлов);
- Основная опухоль (Her2-позитивный) – метастатический лимфоузел (Люминальный В Her2-позитивный) – 4,7% (12,2% от всех измененных фенотипов лимфоузлов).

Изменения молекулярного фенотипа опухоли в метастазе по сравнению с первичной опухолью по результатам ИГХ исследования наблюдались в 13 из 64 проанализированных случаев, что составило 20,3%. При этом изменения также касались в основном люминальных фенотипов. Первоначальный Люминальный А фенотип изменился на Люминальный В в 7 случаях (53,8% от всех измененных фенотипов лимфоузлов), Люминальный В Her2-негативный на Люминальный А в 4 случаях (30,8% от всех измененных фенотипов лимфоузлов), в 1 случае (7,7% от всех измененных фенотипов лимфоузлов) Люминальный В Her2-негативный изменился на Люминальный В Her2-позитивный подтип и в 1 случае Люминальный А изменился на трижды негативный рак фенотип (7,7% от всех измененных фенотипов лимфоузлов). Проведенный анализ показал, что увеличение злокачественности при использовании метода ИГХ составило 12,5% от всех исследованных опухолей.

Таким образом, выполненные молекулярно-генетические исследования фенотипа продемонстрировали высокий процент расхождения между молекулярными характеристиками основного опухолевого узла и регионарных

лимфатических узлов – 41%, тогда как при сравнении этих же показателей методом ИГХ наблюдалось изменение только в 20,3% случаев. При этом, если пациенту не проводить специальное исследование пораженных лимфоузлов, включающее ИГХ, а лучше сочетание ИГХ и молекулярно-генетического исследования, то назначение программ терапии будет основываться только на данных, полученных при исследовании основной опухоли.

Если в 11% случаев, когда изменение фенотипа на основании молекулярно-генетического исследования происходит в сторону уменьшения злокачественности, отсутствие данных о молекулярном подтипе метастаза в лимфоузлы может не оказывать существенного влияния на выбор тактики лечения, то в 28%, когда метастатический узел имеет более высокую степень злокачественности, пациенты могут получать недостаточное лечение и отсутствие данных о молекулярном фенотипе пораженных лимфоузлов может являться критическим фактором.

Полученные результаты свидетельствует о необходимости выполнения дополнительных исследований молекулярного фенотипа в метастазах с привлечение молекулярно-генетических методов для оптимизации системного лечения у больных раком молочной железы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день рак молочной железы занимает лидирующие позиции в структуре онкологических заболеваний среди женского населения [22, 126], а также является основной причиной смерти от опухолевого процесса у данной категории пациенток [32, 42]. Главными причинами, обуславливающими высокие показатели летальных исходов, остаются прогрессирование заболевания на разных этапах болезни более чем у половины больных [115, 139, 141], а также недостаточная эффективность проводимого системного лечения [4, 33]. Согласно отечественным и международным рекомендациям выбор терапии и прогноз заболевания при раке молочной железы в данный момент определяется биологическими характеристиками опухоли и назначается с учетом ее молекулярных подтипов [87, 120], к которым относят люминальный тип А, люминальный тип В (Her2-отрицательный), люминальный тип В (Her2-положительный), Her2-положительный и базальноподобные (трижды негативные) опухоли. По современным представлениям для этой цели оцениваются рецепторный статус (рецепторы эстрогенов и прогестерона), статус Her2/neu, а также маркер клеточной пролиферации Ki67, определяемые иммуногистохимическим анализом (ИГХ) ткани основного опухолевого узла и пораженных лимфатических узлов [134, 172].

Несмотря на то, что классификация на основании иммуногистохимических маркеров получила широкое признание и применение, этот метод имеет ограниченную способность и может привести к погрешностям и неточностям в постановке правильного диагноза, что обусловлено результатами исследований многих ученых [47, 48, 75, 223]. Существующие в настоящее время тесты на основе экспрессии генов в большей степени свидетельствуют о риске прогрессирования заболевания, в меньшей о чувствительности опухоли к проводимому лечению [184, 199].

Все вышесказанное обуславливает необходимость разработки и внедрения новых методов фенотипирования рака молочной железы, что позволит существенно повысить чувствительность и специфичность исследования по сравнению с использованием классической ИГХ модели. В частности, в настоящее время на базе ФГБУ «Российского научного центра рентгенорадиологии» (РНЦРР) разработана отечественная мультигенная модель с включением генов, отвечающих за основные механизмы жизнедеятельности опухолевой клетки: клеточная пролиферация, апоптоз, клеточная дифференцировка и межклеточное взаимодействие [2].

Целью настоящего исследования являлось изучение клинической значимости отличий определения фенотипических признаков опухоли на основании морфологических и молекулярно-генетических методов.

В исследование было включено 358 больных раком молочной железы, (T1-3N0-3M0), получавших лечение на базе ФГБУ «Российский Научный Центр Рентгенорадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации в период с 2015 по 2017 годы. У всех больных проводился анализ операционного материала, а у 64 был проведен молекулярно-генетический анализ и определены молекулярные фенотипы первичной опухоли и метастатических лимфоузлах.

При проведении исследования преобладали пациентки 50 лет и старше – 308 (86%) и находящиеся в состоянии менопаузы – 277 (77%). Средний возраст больных составил $61,22 \pm 10,4$ лет (от 34 до 81 лет). Среди больных, вошедших в исследование, большее количество пациентов отмечалось без поражения аксиллярных лимфатических узлов (N0) – 164 (45,8%) и со ПА стадией (T1-2N0-1M0) опухолевого процесса – 127 (35,5%).

По результатам гистологического исследования опухоли молочной железы были представлены инвазивной карциномой неспецифического типа – 174 (48,6%), дольковым раком – 78 (21,8%), дольково-протоковым раком – 77 (21,5%), а также редкими формами – 29 (8,1%). У 38 (10,6%) больных была

установлена I степень злокачественности опухоли, у 218 (60,9%) – II степень злокачественности и у 102 (28,5%) пациенток III степень злокачественности.

Всем больным выполнялся хирургический этап лечения в объеме радикальной мастэктомии – 175 (49%), органосохраняющих операций – 121 (34%), а также подкожной мастэктомии, аксиллярной лимфаденэктомией с одномоментной реконструкцией молочной железы – 62 (17%). По показаниям проводились курсы неoadъювантной и адъювантной химиотерапии, гормональная и таргетная терапия, а также лучевая терапия.

На этапе диагностики всем пациенткам проводилось полное клинкорентгенологическое обследование, которое включало клинический осмотр, общеклинические анализы, рентгенографию, маммографию, УЗИ молочных желез, зон регионарного лимфооттока, печени. Дополнительные методы диагностики (магнитно-резонансная томография головного мозга, компьютерная томография органов грудной клетки и остеосцинтиграфия) выполнялись по показаниям. Стадирование опухолевого процесса осуществлялось согласно международной классификации по системе TNM (2009).

Морфологическое и иммуногистохимическое исследование выполнялось в патологоанатомическом отделении ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России с изучением биопсийного и операционного материалов ткани первичного опухолевого узла, а также всех удаленных лимфатических узлов выполнялись по стандартной методике. Диагноз РМЖ устанавливался согласно «Гистологической классификации опухолей молочной железы» (ВОЗ, 2012). Степень злокачественности опухоли определялась в соответствии с критериями Elston-Ellis. Иммуногистохимическим методом определялась экспрессия рецепторов эстрогена (антитела PA0151, клон 6F11, Leica Microsystems), прогестерона (PA0312, клон 16, Leica Microsystems), рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu (антитела A0485, Dako, Дания) и маркера клеточной пролиферации Ki-67 (антитела PA0118, клон MM1, Leica Microsystems).

Оценка экспрессии рецепторов к половым гормонам проводилась полуколичественным способом по D.C. Alldred et. al. (подсчету подвергалась только ядерная реакция). Положительная экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона оценивалась при суммарном количестве баллов более 3 (>3). Пролиферативная активность определялась в ядрах опухолевых клеток, экспрессирующих Ki67. Оценка экспрессии рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu выполнялась согласно рекомендациям Wolff et. al. с помощью иммуногистохимического метода с учетом только инвазивного компонента опухоли: негативными считались случаи с отсутствием окрашивания или со слабым, прерывистым мембранным окрашиванием (категории 0 и 1+), положительными – случаи с сильным окрашиванием всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток (категории 3+).

При слабом до умеренного окрашивания всей цитоплазматической мембраны более 10% опухолевых клеток (категории 2+) всем пациенткам выполнялся FISH-анализ (флуорисцентная гибридизация *in situ*) по стандартной методике. Положительными считались результаты теста при соотношении среднего количества копий гена *Her2/neu* и среднего числа центромер хромосомы 17 в клетке более 2,2.

По результатам иммуногистохимического анализа производилось распределение больных РМЖ на молекулярно-биологические подтипы согласно рекомендациям RUSSCO от 2019 года.

По результатам иммуногистохимического исследования больные раком молочной железы были распределены в зависимости от уровня экспрессии рецептора эстрогена: количество пациентов с отрицательным статусом рецептора эстрогена составило 76 (21,2%) случаев, положительным – 282 (79,9%). В подгруппе с РЭ-позитивными опухолями преобладали больные со значениями 7 и более баллов – 226 (62,6%). По данным ОТ-ПЦР был выявлен широкий диапазон значений экспрессии РЭ в пределах от 0 до несколько тысяч условных единиц с максимальными значениями в интервале от 5 до 8 условных единиц. Также обращает на себя внимание 2 пика экспрессии, которые можно

отнести к РЭ-положительным опухолям (уровень ESR1 больше 4) и РЭ-отрицательным опухолям (значение менее 4) (значение 4 было принято нами в качестве условной границы для разделения РЭ+ и РЭ- опухолей).

При анализе группы образцов опухолевой ткани с отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена (нулевая экспрессия) по данным ИГХ средний уровень экспрессии был достоверно ниже, чем в среднем по образцам, однако «не нулевой» уровень определялся в большем количестве случаев. Проводился корреляционный анализ экспрессии рецепторов эстрогена, определяемых методами ИГХ и ОТ-ПЦР, по результатам которого коэффициент корреляции между уровнем экспрессии эстрогеновых рецепторов, диагностированных методом ПЦР (не логарифмированная величина) и ИГХ, имел низкое значение и составил 0,23. В тоже время, коэффициент корреляции между логарифмом уровня экспрессии (метод ПЦР) и уровнем экспрессии (методом ИГХ) составил 0,7765, что соотносится с высокой корреляцией.

По данным ИГХ исследования операционного материала количество случаев с отрицательной экспрессией РП составило 127 (35,5%); с положительной – 231 (64,5%). При этом, наибольшее количество положительных случаев приходилось на экспрессию рецепторов прогестерона в 8 и 9 баллов (17,6 и 18% соответственно). По результатам ОТ-ПЦР практически для всех РП-отрицательных опухолей, выявленных методом ИГХ, обнаруживаются «не нулевые» уровни экспрессии маркера при проведении ПЦР исследования. Корреляционный анализ экспрессии рецептора прогестерона, определенного методами ИГХ и ОТ-ПЦР, также продемонстрировал закономерности, что и при изучении уровня экспрессии эстрогена. При этом, обращает на себя внимание отсутствие «провала» в регистрации уровней экспрессии рецептора прогестерона, определяемых методом ИГХ в диапазоне значений 2-4.

Гиперэкспрессия эпидермального фактора роста Her2/neu (показатели 2+ и 3+) была выявлена у 109 пациентов (30,4% больных), в то время как отрицательный статус маркера (0 и 1+) обнаруживался у 249 (69,6%) больных

по данным ИГХ. По данным ОТ-ПЦР образцов ткани с гиперэкспрессией рецептора эпидермального фактора роста 2 типа по результатам ИГХ было выявлено, что при проведении ОТ-ПЦР практически отсутствуют образцы с низким уровнем экспрессии (если дифференцирующий уровень выбрать равным 4, по аналогии с рецепторами эстрогена и прогестерона).

При анализе образцов, у которых по данным ИГХ статус Her2 был определен как «отрицательный» (0 и 1+) напротив, более половины таких образцов имело высокие значения экспрессии мРНК Her2/neu. Проведенный корреляционный анализ продемонстрировал высокое соотношение результатов ИГХ исследования и метода ОТ-ПЦР.

При проведении корреляционного анализа экспрессии маркера клеточной пролиферации Ki67 обращал на себя внимание тот факт, что в отличие от показателей экспрессии эстрогенов и прогестерона, для которых уровень корреляции для логарифмов значений был существенно выше; для Ki67 коэффициенты корреляции для абсолютного и логарифмированного показателя практически не отличались. При проведении линейной корреляции между показателями нами было получено уравнение регрессии, что позволяет вычислить уровень экспрессии Ki67, определенный методом ПЦР что важно для дифференциации Люминального А и В фенотипов.

В тоже время, следует подчеркнуть, что наши результаты показывают важность использования молекулярно-генетических методов для оценки уровня экспрессии клинически значимых молекулярных маркеров, таких как рецепторы гормонов или рецепторы факторов роста, оценки которых являются ключевыми для назначения таргетной терапии. Эти данные согласуются с имеющимися исследованиями по сравнению методов определения экспрессии рецепторов методами ПЦР, ИГХ, FISH и др., в которых показано, что метод количественного ПЦР дает более объективные оценки по сравнению с методами визуализации [178, 186, 227].

По результатам проведенного иммуногистохимического анализа осуществлялось молекулярное типирование злокачественных опухолей

молочной железы с выделением 5 подтипов. Люминальный тип А был выявлен у 129 (36%) больных; люминальный В (Her2-негативный) у 110 (30,7%); люминальный В (Her2-позитивный) у 49 (13,7%); трижды негативный у 54 (15,1%); Her2-позитивный 16 (4,5%) [178].

Отнесение опухоли к молекулярному фенотипу на основании методов ИГХ и молекулярно-генетического типирования показало, что общий процент совпадений для всех фенотипов составил 71,9, что позволяет говорить об удовлетворительном сопоставлении результатов при использовании обоих методов. Однако более подробный анализ показывает, что высокие показатели совпадения отмечаются лишь у трижды негативного и Her2-позитивного фенотипов (75 и 90%).

В тоже время обращает на себя внимание тот факт, что наибольшие ошибки классификации наблюдаются для Люминальных А и В фенотипов (процент совпадений: Люминальный А тип – 65,1%; Люминальный В Her2-негативный тип – 67,4%; Люминальный В Her2-позитивный – 62,1%). Эти результаты коррелируют с результатами ряда иностранных авторов, указывавших, что ИГХ метод определения фенотипа дает значимые расхождения при сравнении с экспрессионным методом и именно при дифференциации Люминальных фенотипов [186, 227].

Поскольку разделение Люминальных А и В фенотипов играет существенную роль в планировании тактики системного лечения, результаты, полученные в настоящем исследовании свидетельствуют о необходимости внедрения молекулярно-генетического метода верификации молекулярного фенотипа РМЖ, что сопоставимо с актуальной задачей современной практической онкологии.

При изучении экспрессии генов ОТ-ПЦР наиболее значимыми генами в распределении на подтипы рака молочной железы являлись гены STK15, MYC, MYBL2; BIRCC5, BCL2, TERTSRP1, PGR, HER2, GBR7, MGB1, MMP11. Среди них отвечающими за дифференцировку/рецепторный статус являются гены: ESRP1, PGR, HER2^{new}, GBR7, MGB1. Показано, что гены, кодирующие

поверхностные рецепторы гормонов ESRP1 и PGR достоверно отличаются во всех пяти подтипах и имеют наиболее высокий уровень экспрессии в люминальном А подтипе, что согласуется с современной иммуногистохимической классификацией РМЖ.

Также люминальный тип А отличает наиболее высокий уровень экспрессии маммоглобина (MGB1), что характеризует достаточно высокую степень дифференцировки клеток РМЖ данного подтипа. Низкий уровень MGB1 был обнаружен в подтипах, отличающихся высокой степенью злокачественности: трижды негативный и люминальный В Her2-негативный. Уровень экспрессии рецептора эпидермального фактора роста 2 типа, ответственного за рост и размножение клеток, имел достоверные отличия между подтипами. При этом, если случаи максимальных значений были закономерно получены для Her2-позитивного подтипа, то минимальные уровни были отмечены при трижды негативном подтипе, что также может свидетельствовать о снижении дифференцировочных маркеров в клетках этого типа РМЖ, либо замене Her2/neu на рецепторы других подтипов семейства Her2.

Интересно отметить, что уровень экспрессии гена матричной металлопротеиназы 11 (MMP11), достоверно отличающийся в подтипах РМЖ, был наиболее высоким в Her2-позитивном подтипе и имел одинаково низкие значения при трижды негативном и люминальном В Her2-негативном подтипах. Уровень матричных металлопротеиназ косвенно отражает способность к инвазии опухолевых клеток и его высокие значения могут свидетельствовать, как о высокой инвазивной способности, так и о метастатической активности опухоли. Однако в данном случае, с учетом отсутствия данных об экспрессии других металлопротеиназ, мы не можем утверждать, что значения MMP11 в полной мере отражают потенциал к инвазии и/или метастазированию подтипов РМЖ.

Активация теломеразы (TERT) в целом характеризует неконтролируемое деление и отсутствие старения опухолевых клеток. Нами было показано, что

высокий уровень TERT соответствовал высоко злокачественному трижды негативному подтипу, а высокий уровень TERT отмечен при люминальном В Her2-позитивном подтипе и при Her2-негативном РМЖ. Наиболее низкие значения экспрессии TERT показаны для люминального А и люминального В Her2 – негативного подтипов. Экспрессия TERT четко характеризует наиболее злокачественные подтипы, в случае же люминального В Her2-позитивного подтипа, характеризующегося достаточно агрессивным течением, относительно низкий уровень TERT возможно объясняется наличием других механизмов сохранения теломер, например, ALT (альтернативное удлинение теломер, *alternative lengthening of telomeres*). Интересно отметить тот факт, что в литературных источниках практически отсутствуют публикации посвященные исследованию уровня TERT при различных подтипах РМЖ, хотя полученные нами результаты свидетельствуют о несомненной взаимосвязи TERT и злокачественности процесса, а активность теломераз является одним из ключевых показателей пролиферативной активности опухолевых клеток.

В молекулярно-генетическую классификацию подтипов РМЖ также вносили большой вклад гены, ответственные за процессы пролиферации: транскрипционные факторы – MYC (достаточно широко описанный в литературе, показана его гиперэкспрессия при многих онкологических заболеваниях, коррелирующая с опухолевым ростом); MYBL2; STK-15, ген, отвечающий за синтез Aurora A киназы, регулирующий процесс разделении хромосом (в нашем исследовании достоверно отличается экспрессия STK-15 в фенотипах РМЖ, однако, в отличии от литературных данных, отмечающих наибольший уровень в трижды негативном подтипе, наиболее высокие значения получены при люминальном В Her2-позитивном, а наименьшие значения, согласующиеся с литературными данными, при люминальном А подтипе).

Внесшими наибольший вклад в дифференцировку молекулярных фенотипов генами, ответственными за процессы апоптоза, являлись ингибиторы апоптоза BIRC5 и BCL2. Причем, если BCL2 предсказуемо был

увеличен при люминальном А типе и имел минимальные значения при трижды негативном РМЖ, наиболее высокие значения VIRC5 получены для подтипов трижды негативный и Люминальный В Her2-позитивный. Полученные значения VIRC5 скорее отражают его участие в процессах пролиферации, как известно, уровень VIRC5 возрастает при смене фаз клеточного цикла G2 M и играет определенную роль при митозе. В этом случае, высокие значения VIRC5 в фенотипах трижды негативного и Люминального В Her2-позитивного раков согласуются с результатами, полученными нами по оценке генов, ответственных за процессы пролиферации – TERT, STK-15.

В проведенном исследовании показано, что маркер клеточной пролиферации Ki67, играющий одну из ключевых ролей в иммуногистохимическом типировании люминальных подтипов рака молочной железы, не вносит значимого вклада в дифференцирующую модель. В настоящее время встречается достаточно большое количество исследований, в которых значимость определения Ki67 при постановке диагноза остается под вопросом. Не вызывает сомнений взаимосвязь пролиферативной активности опухолевой ткани и уровня экспрессии Ki67, однако, показано, что данный маркер не имеет четкой связи с молекулярным фенотипом и может широко колебаться внутри группы.

По результатам морфологического и иммуногистохимического исследований операционного материала пораженных лимфатических узлов преобладали больные с люминальным А и Люминальным В Her2-отрицательными подтипами (46,8 и 23,4% соответственно). Меньшее количество пациентов отмечалось в подгруппе с люминальным Her2-позитивным раком и Her2-позитивными подтипами РМЖ (6,3 и 6,3% соответственно). Проведенное изучение молекулярных фенотипов основного опухолевого и пораженных аксиллярных лимфатических узлов показало, что в 41% случаев фенотип метастатических лимфоузлов отличается от первичной опухоли. При этом, если придерживаться теории, что злокачественность РМЖ увеличивается в ряду (Люминальный А > Люминальный В Her2-отрицательный > Люминальный В

Her2-положительный > Her2-позитивный > Трижды негативный), то в 68,3% случаев изменение фенотипа прошло по пути увеличения злокачественности. Полученный результат хорошо согласуется с литературными данными, приобретение новых свойств опухолью для обретения метастатического потенциала и/или изменение фенотипа метастаза при воздействии другого клеточного окружения. В то же время, наличие 31,7% случаев снижения злокачественности также может являться результатом изменения окружения опухолевых клеток при попадании в лимфотический узел, но может и быть результатом терапевтического воздействия на первичную опухоль. Эти данные могут говорить, с одной стороны о «пластичности» или нестабильности молекулярного фенотипа рака молочной железы, а с другой могут отражать гетерогенность молекулярного фенотипа первичной опухоли, как результат наличия гетерогенности молекулярных свойств в первичном узле опухоли, на что указывает ряд авторов [223]. Несомненно, что обнаруженные отличия фенотипов являются важной информацией с точки зрения рекомендаций для адьювантной терапии, они показывают, что при планировании программ лечения, необходимо исследование молекулярного фенотипа не только основной опухоли, но и метастатических узлов.

Таким образом, данная работа позволила оценить возможность использования методики ОТ-ПЦР для изучения рецепторного статуса опухоли (рецепторов эстрогена и прогестерона), статуса эпидермального фактора роста Her2/neu и маркера клеточной пролиферации Ki67; сравнить с результатами стандартного иммуногистохимического анализа и показала необходимость внедрения молекулярно-генетических методов в клиническую практику. Полученные результаты обосновывают использование методов молекулярной биологии в онкологии и маммологии, доказывают, что определение подтипов РМЖ должно быть расширено, при определении фенотипов РМЖ должны быть использованы современные молекулярные методы, в частности метод ОТ-ПЦР, позволяющий существенно повысить точность диагностики. Полученные

результаты свидетельствуют о необходимости совокупного учета молекулярно-генетических параметров в оценке первичного опухолевого узла и пораженных лимфатических узлов. Показывают важность определения молекулярного фенотипа метастатических лимфоузлов для оптимального планирования тактики системного лечения РМЖ.

ВЫВОДЫ

1. При низких показателях экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона (менее 4 баллов) и рецептора эпидермального фактора роста Her2/neu (значения 0 и 1+), определяемых иммуногистохимическим методом, целесообразно проведение дополнительных исследований количественными молекулярно-генетическими методами для снижения частоты ложно отрицательных результатов у больных раком молочной железы.
2. Дифференцирование Люминальных А и В подтипов рака молочной железы на основании оценки уровня экспрессии Ki67 методом ИГХ вносит основные ошибки в определении истинного молекулярного фенотипа, что требует внедрения дополнительных молекулярно-генетических методов оценки на основании анализа экспрессионных профилей опухоли.
3. Сопоставление результатов типирования рака молочной железы, определяемых данными иммуногистохимического и ОТ-ПЦР исследований (совпадение в 71,9%) диктует необходимость совокупного учета параметров для повышения информативности и точности распределения злокачественных опухолей на подтипы.
4. Анализ молекулярного фенотипа ткани первичной опухоли и метастазах опухоли в регионарные лимфатические узлы, определяемого путем изучения профиля экспрессии комплекса генов методом количественного ПЦР, выявил несовпадение в 40,6% случаев, что может служить основанием для рекомендации проведения такого исследования для планирования более эффективного системного лечения больных раком молочной железы.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Пациенткам с раком молочной железы для более точной оценки рецепторного статуса опухоли (рецепторов стероидных гормонов и эпидермального фактора роста Her2/neu), а также маркера клеточной пролиферации Ki67 необходимо сочетание стандартного иммуногистохимического исследования с анализом генной экспрессии, определяемой методом ОТ-ПЦР.
2. Больным раком молочной железы для оптимального распределения опухолей на подтипы целесообразно сочетание стандартного иммуногистохимического анализа с изучением экспрессионных панелей, например панели, используемой в данном исследовании и состоящей из 24 генов, определяемых методом ОТ-ПЦР.
3. Для назначения адекватной тактики системного лечения у больных раком молочной железы целесообразно изучение молекулярно-генетических характеристик первичного опухолевого узла и пораженных регионарных лимфатических узлов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабышкина Н.Н. Роль рецептора эпидермального фактора роста EGFR в эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных тройным негативным раком молочной железы. / Н.Н. Бабышкина, Т.А. Дронова, Е.А. Замбалова, М.В. Завьялова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2020. – Т.1. – С. 13 – 20.
2. Боженко В.К. Маммоглобин в периферической крови и опухоли при раке молочной железы / В.К. Боженко, Н.В. Харченко, Е.Ф. Васкевич, Е.А. Кудинова и др. // Биомедицинская химия. – 2016. – Т.4. (62) – С. 453 – 457.
3. Гиголаева Л.П. Оценка эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных с местно-распространенным BRCA-ассоциированным раком молочной железы / Л.П. Гиголаева, А.А. Бессонов, П.В. Криворотько, и др. // Злокачественные опухоли. – 2018. – Т.3. – С. 29 – 36.
4. Дергунова Ю.А. Клинико-морфологические и молекулярно-биологические предикторы метастатического поражения регионарных лимфатических узлов у больных раком молочной железы / Ю.А. Дергунова, В.В. Родионов, В.В. Кометова // Злокачественные опухоли. – 2019. – Т.9. – С. 12 – 19.
5. Имянитов Е.Н. Биология рака молочной железы / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2017. – Т.3. – С. 221 – 231.
6. Имянитов Е.Н. Роль молекулярно-генетической диагностики в практической онкологии / Е.Н. Имянитов // Практическая онкология. – 2019. – Т.4. – С. 261 – 273.
7. Ким А.Я. Исследование NSABP В-04 25 лет спустя: уроки для современного онколога / А.Я. Ким, Л.И. Маркушин, С. А. Волчёнков, В.К. Осетник и др. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2019. – Т.2. – С. 52 – 56.

8. Мирюсупова Г.Ф. Клинические характеристики Her2-позитивного рака молочной железы / Г.Ф. Мирюсупова, Г.А. Хакимов, Н.Р. Шаюсупов // Вопросы онкологии. – 2017. – Т.4. – С. 587 – 592.
9. Палтуев Р. М. Биологическое обоснование персонализации лечения рака молочной железы. Клиническое значение определения новых маркеров рака молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2019. – Т.2. – С. 10 – 29.
10. Палтуев Р. М. Биологическое обоснование персонализации лечения рака молочной железы. Анализ новых данных используемых в рутинной практике маркеров рака молочной железы // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2019. – Т.2. – С. 39 – 49.
11. Семиглазов В. В. Стратегия постнеoadьювантного лечения пациенток с резидуальным раком молочной железы / В.В. Семиглазов, А.А. Натопкин // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2020. – Т.1. – С. 43 – 54.
12. Стенина М.Б. Изменения в нео- и адьювантном лечении рака молочной железы за последние 5 лет / М.Б. Стенина, М.А. Фролова, Д.З. Купчан, С.А. Тюляндин // Практическая онкология. – 2017. – Т.3. – С. 256 – 264.
13. Ткачев С.И. Предварительные результаты комплексного лечения больных раком молочной железы, включающего реконструктивно-пластическую операцию, химиотерапию и конформную лучевую терапию / С.И. Ткачев, А.В. Назаренко, Е.В. Тимошкина, В.А. Соболевский и др.// Вопросы онкологии. – 2017. – Т. 4. – С. 557 – 567.
14. Шатова Ю.С. Роль оценки совокупности клинико-морфологических данных для прогнозирования поражения регионарных лимфатических узлов при раннем раке молочной железы / Ю.С. Шатова, Л.Н. Ващенко, Е.С. Босенко, С.М. Бакулина и др. // Опухоли женской репродуктивной системы. – 2019. – Т.1. – С. 29 – 34.
15. Павленко И.А. Амплификация гена HER2/neu как механизм возникновения клональной гетерогенности при раке молочной железы / И.А.

Павленко, Л.Е. Завалишина, П.Е. Повилайтите // Архив патологии. – 2019. – Т.6. – С. 49 – 55.

16. Фролова М.А. Прогностическое значение биологических характеристик резидуальной опухоли после проведения неoadъювантной химиотерапии при раннем раке молочной железы с тройным негативным фенотипом / М.А. Фролова М.А., М.Б. Стенина, Е.В. Глазкова Е.В., Е.О. Игнатова и др. // Злокачественные опухоли. – 2019. – № 3. – С. 5 – 11.

17. Abubakar M. Combined quantitative measures of ER, PR, HER2, and KI67 provide more prognostic information than categorical combinations in luminal breast cancer / M. Abubakar, J. Figueroa, H. Ali, F. Blows et al. // Mod Pathol. – 2019. – Apr 11.

18. Altundag K. Adjuvant chemotherapy might show benefit in luminal B breast cancer patients with isolated locoregional recurrence / K. Altundag // J BUON. – 2019. – Vol. 24 (1). – P. 405 – 406.

19. Álvarez-Fernández R. Explanatory chapter: PCR primer design / R. Álvarez-Fernández // Methods Enzymol. – 2013. – Vol. 529. – P. 1 – 21.

20. Alzubi M. Separation of breast cancer and organ microenvironment transcriptomes in metastases / M. Alzubi, T. Turner, A. Olex, S. Sohal et al. // Breast Cancer Res. – 2019. – Vol. 21 (1) – P. 36.

21. Amir E. Endpoint selection in HER2-positive early breast cancer / E. Amir // Lancet Oncol. – 2019. – Vol. 20 (3) – P. 315 – 316.

22. Anastasiadi Z. Breast cancer in young women: an overview / Z. Ignatiadi, G. Lianos, E. Ignatiadou, H. Harissis et al. // Updates Surg. – 2017. – Vol.69 (3). – P.313 – 317.

23. Angus, L. ESR1 mutations: Moving towards guiding treatment decision-making in metastatic breast cancer patients / L. Angus, N. Beije, A. Jager, J. Martens et al. // Cancer Treat Rev. – 2017. – Vol. 52. – P. 33 – 40.

24. Arena V. ER-/PR+/HER2-breast cancer type shows the highest proliferative activity among all other combined phenotypes and is more common in young

patients: Experience with 6643 breast cancer cases / V. Arena, I. Pennacchia, F. Vecchio, A. Carbone // *Breast J.* – 2019. – 23 (3). – P. 381 – 385.

25. Aure M. Integrative clustering reveals a novel split in the luminal A subtype of breast cancer with impact on outcome / M. Aure, V. Vitelli, S. Jernström, S. Kumar et al. // *Breast Cancer Res.* – 2017. – Vol. 19 (1). – P. 44.

26. Ayoub N. Immunotherapy for HER2-positive breast cancer: recent advances and combination therapeutic approaches / N. Ayoub, K. Al-Shami, R. Yaghan // *Breast Cancer* (Dove Med Press). – 2019. – Vol. 11. – P. 53 – 69.

27. Bachman J. Reverse-transcription PCR (RT-PCR) / J. Baachman // *Methods Enzymol.* – 2013. – Vol. 530. – P. 67 – 74.

28. Hirata B. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior / B. Hirata, J. Oda, R. Losi Guembarovski, C. Ariza et al. // *Dis. Markers.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 513158.

29. Barroso-Sousa R. Personalized chemotherapy in triple-negative breast cancer: are we ready for prime time? / R. Barroso-Sousa, G. Shapiro, S. Tolaney // *Stem Cell Investig* – 2019. – Vol. 6. – P. 42019.

30. Barroso-Sousa R. The immune profile of small Her2-positive breast cancers: a secondary analysis from the APT trial / R Barroso-Souse, W. Barry, H. Guo, D. Dillon et al. // *Ann Oncol.* – 2019. – Vol. 30 (4). – P. 575 – 581.

31. Beltjens F. Her2-positivity rates in breast cancer: no variation over time when clinicopathological features and testing are stable / F. Beltjens, A. Bertaut, S. Pigeonnat, C. Loustalot et al. // *Eur J Cancer Care.* – 2017. – Vol. 26 (2). – e12404.

32. Bens A. Worse survival after breast cancer in women with anorexia nervosa // A. Bens, F. Papadopoulos, E. Pukkala, A. Ekbom et.al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2018. – Vol 2. – P. 495 – 500.

33. Bitencourt A. Role of MRI in the staging of breast cancer patients: does histological type and molecular subtype matter? / A. Bitencourt, N. Pereira, L. França, C. Silva // *Br J Radiol.* – 2015. – Vol. 88 (1055). – P. 20150458.

34. Bivin W. GRB7 Expression and Correlation With Her2 Amplification in Invasive Breast Carcinoma / W. Bivin, O. Yergiyev, M. Bunker, J. Silverman et al. // *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. – 2017. – Vol. 25 (8). – P. 553 – 558.
35. Boyages J. Radiation therapy and early breast cancer: current controversies / J. Boyages // *Med J*. – 2017. – Vol. 207 (5). – P. 216 – 222.
36. Brand T. Correction: Nuclear Epidermal Growth Factor Receptor Is a Functional Molecular Target in Triple-negative Breast Cancer / T. Brand, M. Iida, E. Dunn, N. Luthar et al. // *Mol Cancer Ther*. – 2019. – Vol. 18 (4). – P. 868.
37. Brenner D. Breast cancer survival among young women: a review of the role of modifiable lifestyle factors / D. Brenner, N. Brockton, J. Kotsopoulos, M. Cotterchio et.al. // *Cancer Causes Control*. – 2016. – Vol. 27 (4). – P. 459 – 472.
38. Brisken C. Progesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis / C. Brisken, K. Hess, R. Jeitziner // *Endocrinology*. – 2015. – Vol. 156 (10). – P. 3442 – 3450.
39. Cai K. Ndr1 promotes adipocyte differentiation and sustains their function /K. Cai, R. El-Merahbi, M. Loeffler, A. Mayer et al. // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 7191.
40. Caldarella A. Invasive breast cancer: a significant correlation between histological types and molecular subgroups / A. Caldarella, C. Buzzoni, E. Crocetti, S. Bianchi et al. // *J Cancer Res Clin Oncol*. – 2013. – Vol. 139 (4). – P. 617 – 623.
41. Cao S-S. Recent perspectives of breast cancer prognosis and predictive factors / S-S. Cao, C. Lu // *Oncol Lett*. – 2016. – Vol.12 (5). – P. 3674 – 3678.
42. Carioli G. Trends and predictions to 2020 in breast cancer mortality in Europe / G. Carioli, M. Malvezzi, T. Rodriguez, P. Bertuccio et al. // *Breast*. – 2017. – Vol.36. – P. 89 – 95.
43. Cejalvo J. Clinical implications of the non-luminal intrinsic subtypes in hormone receptor-positive breast cancer / J. Cejalvo, T. Pascual, A. Fernández-Martínez, F. Brasó-Maristany et al. // *Cancer Treat Rev*. – 2018. – Vol. 67. – P. 63 – 70.

- 44.** Chen L. Racial disparities in breast cancer diagnosis and treatment by hormone receptor and HER2 status / L. Chen, C. Li // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* – 2015. - Vol. 24 (11). – P. 1666 – 72.
- 45.** Chiba K. Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing / K. Chiba, J. Johnson, J. Vogan, T.Wagner // *Elife.* – 2015 – Vol.4. – e07918.
- 46.** Chistiakov D. CD68/macrosialin: not just a histochemical marker / D. Chistiakov, M. Killingsworth, V. Myasoedova, A. Orekhov et al. // *Lab Invest.* – 2017 – Vol. 97 (1). – P. 4 – 13.
- 47.** Cianfrocca M. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer / M. Cianfrocca, L. Goldshtein // *The Oncologist* // 2004. – Vol.9. – P. 606 – 616.
- 48.** Coates A. Panel Members. Tailoring therapies improving the management of early breast cancer: St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2015 / A. Coates, E. Winer, A. Goldhirsch, R. Gelber et al. // *Ann Oncol.* – 2015. – Vol. 26. – P.1533 – 1546.
- 49.** Colas C. "Decoding hereditary breast cancer" benefits and questions from multigene panel testing / C. Colas, L. Golmard, A. de Pauw, S. Caputo et al. // *Breast.* – 2019. – Vol. 45. – P. 29 – 35.
- 50.** Connell C. Activating HER2 mutations as emerging targets in multiple solid cancers / C. Connell, G. Doherty // *ESMO Open.* – 2017. – Vol. 2 (5). – P. 000279.
- 51.** Criscitiello C. High Ki-67 score is indicative of a greater benefit from adjuvant chemotherapy when added to endocrine therapy in luminal B HER2 negative and node-positive breast cancer / C. Criscitiello, D. Disalvatore, M. De Laurentiis et al. // *Breast.* – 2014. – Vol.23 (1). – P. 69 – 75.
- 52.** Curado M. What to expect from the 2018 ASCO/CAP HER2 guideline in the reflex in situ hybridization test of immunohistochemically equivocal 2+ cases? // A. C aramelo, C. Eloy, A. Polónia // *Virchows Arch.* – 2019. – Vol. 475 (3). – P. 303 – 311.

- 53.** Dalmau E. Current status of hormone therapy in patients with hormone receptor positive (HR+) advanced breast cancer / E. Dalmau, A. Armengol-Alonso, M. Muñoz, M. Seguí-Palmer // *Breast*. – 2014. - Vol.23 (6). – P. 710 – 720.
- 54.** Deblois G. Oestrogen-related receptors in breast cancer: control of cellular metabolism and beyond / G. Deblois, V. Giguère // *Nat Rev Cancer*. – 2013. – Vol.13 (1). – P. 27 – 36.
- 55.** Del Vesco A. Effects of methionine supplementation on the expression of protein deposition-related genes in acute heat stress-exposed broilers / A. Del Vesco, E. Gasparino, D. Grieser, V. Zancanela et al. // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10 (2). – P. 0115821.
- 56.** Ding K. CCNB1 is a prognostic biomarker for ER+ breast cancer / K. Ding, W. Li, Z. Zou, X. Zou et al. // *Med Hypotheses*. – 2014. – Vol. 83. (3) – P. 359 – 364.
- 57.** Donepudi M. Breast cancer statistics and markers / M. Doepudi, K. Kondapalli, S. Amos, P. Venkanteshan // *J Cancer Res Ther*. – 2014. – Vol.10. (3) – P. 506 – 511.
- 58.** Duffy M. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers / M. Duffy, N. Harbeck, M. Nap, R. Molina et al. // (EGTM) *European Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 75. – P. 284 – 298.
- 59.** Tischkowitz E.D. Gene panel sequencing and the prediction of breast cancer risk / E.D. Tischkowitz, P. Pharoah, A. Antoniou, M. // *N Engl J Med*. – 2015. – Vol. 372. – P. 2243 – 2257.
- 60.** Eiger D. Pertuzumab in HER2-positive early breast cancer: current use and perspectives / D. Eiger, N. Pondé, E. Azambuja // *Future Oncol*. – 2019. – Vol. 15 (16). – P. 1823 – 1843.
- 61.** Engstrøm M. Basal markers and prognosis in luminal breast cancer / M. Engstrøm, M. Valla, A. Bofin // *Breast Cancer Res Treat*. – 2017. – Vol. 163 (2). – P. 207 – 217.
- 62.** Ercoli G. Building up a high-throughput screening platform to assess the heterogeneity of HER2 gene amplification in breast cancers / G. Ercoli, G. Lopez, C. Ciapponi, C. Corti et al. // *J. Vis. Exp*. – 2017. – Vol. 13. – P. 233 – 236.

- 63.** Fausto P. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients / P. Fausto, G. Viale, M. Cabiddu, S. Barni // *Breast Cancer Res Treat.* – 2015. – Vol.153. – P. 477 – 491.
- 64.** Finlay-Schultz J. Steroid hormones, steroid receptors, and breast cancer stem cells / J. Finlay-Schultz, C. Sartorius // *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* – 2015. – Vol. 20 (1-2). – P. 39 – 50.
- 65.** Fujii T. Revisiting the definition of estrogen receptor positivity in HER2-negative primary breast cancer / T. Fujii, T. Kogawa, W. Dong, A. Sahin et al. // *Ann Oncol.* – 2017. – Vol. 28 (10). – P. 420 – 428.
- 66.** Fukada I. Pattern of Tumor Shrinkage during Neoadjuvant Chemotherapy Is Associated with Prognosis in Low-Grade Luminal Early Breast Cancer / I. Fukada, K. Araki, K. Kobayashi / *Radiology.* – 2018. – Vol. 286 (1). – P. 49 – 57
- 67.** Fusco N. HER2 aberrations and heterogeneity in cancers of the digestive system: Implications for pathologists and gastroenterologists / N. Fusco, S. Bosari // *World J. Gastroenterol.* – 2016. – Vol. 22. – P. 7926 – 7937.
- 68.** Gándara-Cortes M. Breast cancer subtype discrimination using standardized 4-IHC and digital image analysis / M. Gandara-Cortes, A.Vázquez-Boquete, B. Fernández-Rodríguez, P. Viaño et al. // *Virchows Arch.* – 2018. – Vol. 472 (2). – P. 195 – 203.
- 69.** Gao J. Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review / F. Gao, S. **Swain** // *The Oncologist.* – 2018. – Vol. 23. – P. 556 – 565.
- 70.** Geyer F. The Spectrum of Triple-Negative Breast Disease: High- and Low-Grade Lesions // F. Geyer, F. Pareja, B. Weigelt, E. Rakha et al. // *Am J Pathol.* – 2017. – Vol.187 (10). – P. 2139 – 2151.
- 71.** Giannakeas V. A comparison of two models for breast cancer mortality for women with ductal carcinoma in situ: an SEER-based analysis / V. Giannakeas, V. Sopik, S. Narod // *Breast Cancer Res Treat.* – 2018. – Vol. 69 (3). – P. 587 – 594.

- 72.** Ghaffari K. BIRC5 Genomic Copy Number Variation in Early-Onset Breast Cancer / K. Ghaffari, J. Johnson, J. Vogan, T. Wagner et al. // *Elife*. – 2015. – Vol. 21. – P. 4.
- 73.** Godamudunage M. Grb7 protein RA domain oligomerization / M. Godamudunage, A. Foster, D. Warren, B. Lyons // *J Mol Recognit*. – 2017. – Vol. 30. – P. 8.
- 74.** Godbole M. Progesterone suppresses the invasion and migration of breast cancer cells irrespective of their progesterone receptor status - a short report / M. Godbole, K. Tiwary, R. Badwe, S. Gupta et al. // *Cell Oncol (Dordr)*. – 2017. – Vol. 40 (4). – P. 411 – 417.
- 75.** Goldhirsch A. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer / A. Goldhirsh, E. Winer, A. Coastes, R. Gelber et al. // *Ann Oncol*. – 2013. – Vol. 24 (9). – P. 2206 – 2223.
- 76.** Goss P. Extending aromatase-inhibitor adjuvant therapy to 10 years / P. Goss, J. Ingle, K. Pritchard, N. Robert et al. // *N Engl J Med*. – 2016. – Vol. 375. – P. 209 – 219.
- 77.** Griguol T. Interaction of host immunity with HER2-targeted treatment and tumor heterogeneity in HER2-positive breast cancer / T. Griguol, T. Pascual, M. Dieci, V. Guarneri // *J Immunother Cancer*. – 2019. – Vol. 7 (1). – P. 90.
- 78.** Griguol V. Breast Cancer Genetics for the Surgeon: An Update on Causes and Testing Options / V. Griguol, D. Agnese // *J Am Coll Surg*. – 2016. – Vol. 222. – P. 906 – 914.
- 79.** Guo L. A high-risk luminal A dominant breast cancer subtype with increased mobility / L. Guo, G. Chen, W. Zhang, L. Zhou et al. // *Breast Cancer Res Treat*. – 2019. – P. 1 – 14.
- 80.** Han J. MMP11 and CD2 as novel prognostic factors in hormone receptor-negative, HER2-positive breast cancer / J. Han, Y. Choi, H. Kim, J. Choi et al. // *Breast Cancer Res Treat*. – 2017. – Vol. 164 (1). – P. 41 – 56.

- 81.** Haldosén L. Estrogen receptor beta in breast cancer / L. Haldosen, C. Zhao, K. Dahlman-Wright // *Mol Cell Endocrinol.* – 2014. – Vol. 382 (1). – P. 665 – 672.
- 82.** Halla Mohamed R. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer / R. Halla Mohamed, S. Nervana, A. Mie Nabila, M. Abd El et al. // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.* – 2018. – Vol. 16. – P. 479 – 484.
- 83.** Han H. Molecular Testing and the Pathologist's Role in Clinical Trials of Breast Cancer / H. Han, A. Magliocco // *Clin Breast Cancer.* – 2016. – Vol. 16 (3). – P. 166 – 179.
- 84.** Hantouche C. Bag1 Co-chaperone Promotes TRC8 E3 Ligase-dependent Degradation of Misfolded Human Ether a Go-Go-related Gene (hERG) Potassium Channels / C. Hantouche, B. Williamson, W. Valinsky, J. Solomon et al. // *J Biol Chem.* – 2017. – Vol. 292 (6). – P. 2287 – 2300.
- 85.** Harbeck N. Breast cancer / N. Harbeck, M. Gnant // *Lancet.* – 2017. – Vol. 389 (10074). – P. 1134 – 1150.
- 86.** Hashmi A. Prognostic parameters of luminal A and luminal B intrinsic breast cancer subtypes of Pakistani patients / A. Hashmi, S. Sajar, S. Khan, R. Mboob et al. // *World J Surg Oncol.* – 2018. – Vol. 16. – P. 1.
- 87.** Hayashi S. Mechanisms of hormonal therapy resistance in breast cancer / S. Hayashi, M. Kimura // *Int J Clin Oncol.* – 2015. – Vol.20 (2). – P. 262 – 267.
- 88.** Hedman J. Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR // J. Hedman, P. Rådström // *Methods Mol Biol.* – 2013. – Vol. 943. – P. 17 – 48.
- 89.** Heidenreich B. TERT promoter mutations in telomere biology / B. Heidenreich, R. Kumar // *Mutat Res.* – 2017. – Vol. 771. – P. 15 – 31.
- 90.** Hequet D. Prospective, multicenter French study evaluating the clinical impact of the Breast Cancer Intrinsic Subtype-Prosigna Test in the management of early-stage breast cancers / D. Hequet, C. Callens, D. Gentien, B. Albaud et al. // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12 (10). – P. 0185753.

- 91.** Hertz D. ESR1 and PGR polymorphisms are associated with estrogen and progesterone receptor expression in breast tumors / D. Hertz, N. Henry, K. Kidwell, D. Thomas et al. // *Physiol Genomics*. – 2016. – Vol. 48 (9). – P. 688 – 98.
- 92.** Horlings H. Genomic profiling of histological special types of breast cancer / H. Horlings, B. Weigelt, E. Anderson, M. Lambros et al. // *Breast Cancer Res Treat*. – 2013. – Vol.142 (2). – P. 257 – 269.
- 93.** Huang B. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy / B. Huang, M. Warner, J.Gustafsson // *Mol Cell Endocrinol*. – 2015. – Vol. 418. – P. 240 – 4.
- 94.** Ito H. Molecular epidemiology, and possible real-world applications in breast cancer / H. Ito, K. Matsuo // *Breast Cancer*. – 2016. – Vol. 1. – P. 33 – 38.
- 95.** Iwase H. Treatment strategy for metastatic breast cancer with estrogen receptor-positive tumor / H. Iwase // *Int J Clin Oncol*. – 2015. – Vol. 20 (2). – P.249 – 252.
- 96.** Jouenne F. *CDKN2A/P16INK4A* mutations contribute to genetic determinism of sarcoma / F. Jouenne, I. Chauvot de Beauchene, E. Bollaert, M. Avril et al. // *J Med Genet*. – 2017. – Vol. 54 (9). – P. 607 – 612.
- 97.** Jiang Y. Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies / Y. Jiang, D. Ma, C. Suo, J. Shi et al. // *Cancer Cell*. – 2019. – Vol. 35 (3). – P. 428 – 440.
- 98.** Khosravi-Shahi P. Metastatic triple negative breast cancer: Optimizing treatment options, new and emerging targeted therapies / P. Khosravi-Shahi, L. Cabezón-Gutiérrez, S. Custodio-Cabello // *Asia Pac J Clin Oncol*. – 2018. – Vol.14 (1). – P. 32 – 39.
- 99.** Kim H. Clinicopathological and prognostic significance of programmed death ligand-1 expression in breast cancer: a meta-analysis / H. Kim, J. Lee, J. Koo // *BMC Cancer*. – 2017. – Vol. 17 (1). – P. 690.
- 100.** Kim S. Menopausal hormone therapy and the risk of breast cancer by histological type and race: a meta-analysis of randomized controlled trials and cohort

studies /S. Kim, Y. Ko, H. Lee, J. Lim // *Breast Cancer Res Treat.* – 2018. – Vol. 170 (3). – P. 667 – 675.

101. Krawczyk B. Principles and applications of Ligation Mediated PCR methods for DNA-based typing of microbial organisms /B. Krawczyk, J. Kur, K. Stojowska-Swędryńska, M. Śpibida // *Acta Biochim Pol.* – 2016. – Vol. 63 (1). – P. 39 – 52.

102. Kolak A. Primary and secondary prevention of breast cancer / A. Kolak, M. Kamińska, K. Sygit, A. Budny et al. // *Ann Agric Environ Med.* – 2017. – Vol.24 (4). – P. 549 – 553.

103. Kondov B. Presentation of the Molecular Subtypes of Breast Cancer Detected By Immunohistochemistry in Surgically Treated Patients / B. Kondov, Z. Milenkovic, G. Kondov, G. Petrushevska et al. // *Open Access Maced J Med Sci.* – 2018. – Vol. 6 (6). – P. 961 – 967.

104. Kontzoglou K. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis / K. Kontzoglou, V. Palla, G. Karaolani, I. Karaikos et al. // *Oncology.* – 2013. – Vol. 84. – P. 219 – 225.

105. Kunc M. Estrogen receptor-negative progesterone receptor-positive breast cancer - "Nobody's land" or just an artifact? / M. Kunc, W. Biernat, E. Senkus-Konefka // *Cancer Treat.* – 2018. – Vol. 67. – P. 78 – 87.

106. Kumar N. Quantification of intrinsic subtype ambiguity in Luminal A breast cancer and its relationship to clinical outcomes / N. Kumar, D. Zhao, D. Bhaumik, A. Sethi et al. // *BMC Cancer.* – 2019. – Vol. 19 (1). – P. 215.

107. Kurozumi S. Power of PgR expression as a prognostic factor for ER-positive/HER2-negative breast cancer patients at intermediate risk classified by the Ki67 labeling index / S. Kurozumi, H. Matsumoto, Y. Hayashi, K. Tozuka et al. // *BMC Cancer.* – 2017. – Vol. 17 (1). – P. 354.

108. Lang J. Molecular markers for breast cancer diagnosis, prognosis and targeted therapy /J. Lang, J. Wechsler, M. Press, D. Tripathy // *J Surg Oncol.* – 2015. – Vol. 111 (1). – P. 81 – 90.

- 109.** Lambertini M. Pregnancies in young women with diagnosis and treatment of HER2-positive breast cancer // G. Viglietti // *Oncotarget*. – 2019. – Vol. 10 (8). – P. 803 – 804.
- 110.** Lee C. Fulvestrant for hormone-sensitive metastatic breast cancer / C. Lee, A. Goodwin, N. Wilcken // *Cochrane Database Syst Rev*. – 2017. – Vol. 3. – P. CD011093.
- 111.** Lesurf R. Molecular Features of Subtype-Specific Progression from Ductal Carcinoma / R. Lesurf, A. Alkhateeb, W. ElMaraghy, L. Rueda et al. // *Cell Rep*. – 2016. – Vol. 16 (4). – P. 1166 – 1179.
- 112.** Li J. Clinicopathological classification and traditional prognostic indicators of breast cancer / J. Li, Z. Chen, K. Su, J. Zeng // *Int J Clin Exp Pathol*. – 2015. – Vol 8 (7). – P. 8500 – 8505.
- 113.** Li X. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer / X. Li, J. Yang, L. Peng, A. Sahin et al. // *Breast Cancer Res Treat*. – 2017. – Vol.161 (2). – P.279 – 287.
- 114.** Liang H. PTEN β is an alternatively translated isoform of PTEN that regulates rDNA transcription / H. Liang, X. Chen, Q. Yin, D. Ruan et al. // *Nat Commun*. – 2017. – Vol. 8. – P. 14771.
- 115.** Libson S. A review of clinical aspects of breast cancer / S. Libson, M. Lippman // *Int Rev Psychiatry*. – 2014. – Vol.26 (1). – P. 4 – 15.
- 116.** Liang H. MYBL2 is a Potential Prognostic Marker that Promotes Cell Proliferation in Gallbladder Cancer / H. Liang, Y. Cao, Q. Ma, Y. Shu et.al. // *Cell Physiol Biochem*. – 2017. – Vol. 41 (5). – P. 2117 – 2131.
- 117.** Liu J. The prognostic value of age for invasive lobular breast cancer depending on estrogen receptor and progesterone receptor-defined subtypes: A NCDB analysis // J. Liu, K. Chen, K. Mao, F. Su et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol.7 (5). – P. 6063 – 6073.
- 118.** Løberg M. Benefits and harms of mammography screening / M. Løberg , M. Lousdal, M. Bretthaug, M. Kalager // *Breast Cancer Res*. – 2015. – Vol.17 (1). – P. 63.

- 119.** Lønning P. Microarrays in primary breast cancer-lessons from chemotherapy studies / P. Lønning, T. Sørli, C. Perou, P. Brown et al. // *Endocr Relat Cancer*. – 2001. – Vol.8 (3). – P. 259 – 63.
- 120.** Lopez G. Molecular Insights into the Classification of Luminal Breast Cancers: The Genomic Heterogeneity of Progesterone-Negative Tumors / G. Lopez, J. Costanza, M. Colleoni, L. Fontana et al. // *Int J Mol Sci*. – 2019. – Vol. 20, № 3. – P. 510.
- 121.** Luporsi, E. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review // F. Andre, F. Spyrtos, P. Martin M et al. // *Cancer Res Treat*. – 2012. – Vol.132 (3). – P. 895 – 915.
- 122.** Mackay I. Real-time PCR in the microbiology laboratory // *Clin Microbiol Infect*. – 2004. – Vol. 10 (3). – P. 190 – 212.
- 123.** Malaney P. PTEN proteoforms in biology and disease / P. Malaney, V. Uversky, V. Davé // *Cell Mol Life Sci*. – 2017. – Vol. 74 (15). – P. 2783 – 2794.
- 124.** Marchio C. Predictive Diagnostic Pathology in the Target Therapy Era in Breast Cancer / C. Marchio, D. Balmativola, R. Castiglione, L. Annaratone et al. // *Curr Drug Targets*. – 2017. – Vol. 18 (1). – P.4 – 12.
- 125.** Matsumoto A. Biological markers of invasive breast cancer / A. Matsuoto, H. Jinno, T. Ando, T. Fujii et al. // *Jpn J Clin Oncol*. – 2016. – Vol. 46 (2). – P. 99 – 105.
- 126.** Merino Bonilla J. Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies / J. Merino-Bonilla, M. Torres Tabanera, L. Ros Mendoza // *Radiologia*. – 2017. – Vol. 59 (5). – P. 368 – 379.
- 127.** Minegishi Y. Clinical usefulness of multiplex PCR-lateral flow for the diagnosis of orthopedic-related infections / Y. Minegishi, K. Uchiyama, K. Sakurai, S. Ibe et al. // *Mod Rheumatol*. – 2018. – Vol. 5. – P. 1 – 7.
- 128.** Mohammed H. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer / H. Mohammed, I. Russell, R. Stark, O. // *Nature*. – 2015. – Vol. 523 (7560). – P. 313 – 317.

- 129.** Mohanty A. CCND1 mutations increase protein stability and promote ibrutinib resistance in mantle cell lymphoma / A. Mohanty, N. Sandoval, M. Das, R. Pillai et al. // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7 (45). – P. 73558 – 73572.
- 130.** Morley A. Digital PCR: A brief history// *Biomol Detect Quantif*. – 2014. – Vol. 1. – P. 1 – 2.
- 131.** Muller K. Pathologic Features and Clinical Implications of Breast Cancer With HER2 Intratumoral Genetic Heterogeneity / K. Muller, J. Marotti, L. Tafe // *Am J Clin Pathol*. – 2019. – P. 10.
- 132.** Musa J. MYBL2 (B-Myb): a central regulator of cell proliferation, cell survival and differentiation involved in tumorigenesis / J. Musa, M. Aynaud, O. Mirabeau, O. Delattre // *Cell Death Dis*. – 2017. – Vol. 8 (6). – P. 2895.
- 133.** Musumeci D. An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies / D. Musumeci, G. Roviello, D. Montesarchio // *Pharmacol Ther*. – 2014. – Vol. 141 (3). – P. 347 – 357.
- 134.** Nagini S. Breast Cancer: Current Molecular Therapeutic Targets and New Players / S. Nagini // *Anticancer Agents Med Chem*. – 2017. – Vol.17 (2). – P.152 – 163.
- 135.** Nami B. Her2 in Breast Cancer Stemness: A Negative Feedback Loop towards Trastuzumab Resistance / B. Nami, Z. Wang // *Cancers (Basel)*. – 2017. – Vol. 9 (5). – P. 40.
- 136.** Nilüfer Güler N. Gene Expression Profiling in Breast Cancer and Its Effect on Therapy Selection in Early-Stage Breast Cancer / N. Nilüfer Güler // *Eur J Breast Health*. – 2017. – Vol. 13. – P. 168 – 74.
- 137.** Nishibori M. HMGB1 as a representative DAMP and anti-HMGB1 antibody therapy / M. Nishibori // *Nihon Yakurigaku Zasshi*. – 2018. – Vol. 151 (1). – P. 4 – 8.
- 138.** Nishimura R. Her 2 immunohistochemistry for breast cancer cell blocks can be used in the same way as that used for histological specimens / R. Nishimura, N. Okamoto, M. Satou, K. Kojima et al. // *Diagn Cytopathol*. – 2016. – Vol. 44 (4). – P. 274 – 9.

- 139.** O'Brien K. Eating disorders and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers* / K. O'Brien, D. Whelan, D. Sandler, C. Weinberg R // *Prev.* – 2017. – Vol. 26, № 2. – P.206 – 211.
- 140.** Odle T. Precision Medicine in Breast Cancer / T. Odle // *Radiol Technol.* – 2017. – Vol. 88 (4). – P. 401 – 421.
- 141.** Ogunbiyi S. Primary breast cancer in the elderly: a systematic literature review on histological type and clinical outcome / S. Ogunbiyi, S. Lee, J. Mathew, K. Cheung // *Future Oncol.* – 2015. – Vol. 11 (2). – P. 259 – 265.
- 142.** Ohtani N. The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression / N. Ohtani, K. Yamakoshi, A. Takahashi, E. Hara // *J Med Invest.* – 2004. – Vol. 51 (3 – 4). – P. 146 – 153.
- 143.** Otsuji K. Use of droplet digital PCR for quantitative and automatic analysis of the HER2 status in breast cancer patients / K. Otsuji, T. Sasaki, A. Tanaka, A. Kunita et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2017. – Vol.162 (1). – P. 11 – 18.
- 144.** Parise C. Differences in clinicopathologic characteristics and risk of mortality between the triple positive and ER+/PR+/HER2- breast cancer subtypes / C. Parise, V. Caggiano // *Cancer Causes Control.* – 2019. – Vol. 30 (5). – P. 417 – 424.
- 145.** Penault-Llorca F. Ki67 assessment in breast cancer: an update / F. Penault-Llorca N., Radosevic-Robin // *Pathology.* – 2017. - Vol.49 (2). – P. 166 – 171.
- 146.** Peng J. Neoadjuvant chemotherapy reduces the expression rates of ER, PR, HER2, Ki67, and P53 of invasive ductal carcinoma / J. Peng, X. Zhang, J. Song, L. Ran et al. // *Medicine (Baltimore).* – 2019. – Vol. 98 (2). – P. 13554.
- 147.** Pernas S. HER2-positive breast cancer: new therapeutic frontiers and overcoming resistance / S. Pernas, S. Tolaney // *Ther Adv Med Oncol.* – 2019. – Vol. 11. – P. 758835919833519.
- 148.** Perou C. Molecular portraits of human breast tumours / C. Perou, T. Sørlie, M. Eisen, M. van de Rijn et al. // *Nature.* – 2000. – 406 (6797). – P. 747 – 752.
- 149.** Perou C. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. / C. Perou, S. Jeffrey, M. van de Rijn, C. Rees et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1999. – Vol. 96 (16). – P. 9212 – 9217.

- 150.** Polley M. An international study to increase concordance in Ki67 scoring / M. Polley, S. Leung, D. Gao et al. // *Mod Pathol.* – 2015. – Vol.28 (6). – P. 778 – 86.
- 151.** Posternak V. Strategically targeting MYC in cancer / V. Posternak, M. Cole // *F1000Res.* – 2016. – Vol. 5. – P. 2 – 7.
- 152.** Prado-Vázquez G. A novel approach to triple-negative breast cancer molecular classification reveals a Luminal immune-positive subgroup with good prognoses // G. Prado-Vázquez, A. Gámez-Pozo, L. Trilla-Fuertes, J. Arevalillo et al. // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9 (1). – P. 1538.
- 153.** Prat A. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer // A. Prat, E. Pineda, B. Adamo, P. Galván et al. // *Breast.* – 2015. – Vol. 24 (Suppl. 2). – P.26 – 35.
- 154.** Qi F. Molecular mechanism of triple-negative breast cancer-associated BRCA1 and the identification of signaling pathways / F. Qi, W. Qin, Y. Zang // *Oncology letters.* – 2019. – Vol. 17. – P. 2905 – 2914.
- 155.** Radecka B. Breast cancer in young women / B. Radecka, M. Litwiniuk // *Ginekol Pol.* – 2016. – Vol. 87 (9). – P. 659 – 663.
- 156.** Radenkovic S. HER2-positive breast cancer patients: correlation between mammographic and pathological findings / S. Radenkovic, G. Konjevic, A. Isakovic, P. Stevanovic et al. // *Radiat Prot Dosimetry.* – 2014. – Vol.162 (1 – 2). – P. 125 – 128.
- 157.** Radha G. BCL2: A promising cancer therapeutic target // G. Radha, S. Raghavan // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* – 2017. – Vol. 1868 (1). – P. 309 – 314.
- 158.** Radhi S. Molecular Changes During Breast Cancer and Mechanisms of Endocrine Therapy Resistance / S. Radhi // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2016. – Vol. 144. – P. 539 – 562.

- 159.** Ragab H. Assessment of Ki-67 as a potential biomarker in patients with breast cancer / H. Ragab, N. Samy, M. Afify, M. Maksud et al. // *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. – 2018. – Vol. 16 (2). – P. 479 – 484.
- 160.** Rakha E. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know / E. Rakha, A. Green // *Pathology*. – 2017. – Vol. 49 (2). – P. 111 – 119.
- 161.** Rakha E. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade / E. Rakha, J. Reis-Filho, F. Baehner, D. Dabbs et al. // *Breast Cancer Res*. – 2010. – Vol. 12 (4). – P. 207.
- 162.** Razavi P. The genomic landscape of endocrine-resistant advanced breast cancers // P. Razavi, M. Chang, G. Xu, C. Bandlamudi et al. // *Cancer Cell*. – 2018. – Vol. 34. – P. 427 – 438.
- 163.** Ravdin P. 70 gene signature as an aid to treatment decisions in early stage breast cancer / P. Radvin, I. Rubio, M. Saghatchian M, T. Smilde et al. // *N Engl J Med*. – 2016. – Vol. 375. – P. 717 – 729.
- 164.** Ren C. Intratumoral and peritumoral expression of CD68 and CD206 in hepatocellular carcinoma and their prognostic value / C. Ren, R. Leng, Y. Fan, H. Pan et al. // *Oncol Rep*. – 2017. – Vol. 38 (2). – P. 886 – 898.
- 165.** Romsos E. Rapid PCR of STR markers: Applications to human identification // P. Vallone // *Forensic Sci Int Genet*. – 2015. – Vol. 18. – P. 90-9.
- 166.** Rong C. Estrogen Receptor Signaling in Radiotherapy: From Molecular Mechanisms to Clinical Studies / C. Rong, É. Meinert, J. Hess // *Int J Mol Sci*. – 2018. – Vol.19 (3). – P. 713.
- 167.** Roscilli G. Circulating MMP11 and specific antibody immune response in breast and prostate cancer patients / G. Roscilli, M. Cappelletti, C. De Vitis, G. Ciliberto et al. // *J Transl Med*. – 2014. – Vol. 12. – P. 54.
- 168.** Rosner B. Weight and weight changes in early adulthood and later breast cancer risk / A. Eliassen, A. Toriola, W. Chen et al. // *Int J Cancer*. – 2017. – Vol. 140 (9). – P. 2003 – 2014.

- 169.** Rosenberg S. Management of breast cancer in very young women // A. Partridge // Breast. – 2015. – Vol. 2. – P.154 – 158.
- 170.** Rossi L. The optimal duration of adjuvant endocrine therapy in early luminal breast cancer: A concise review / L. Rossi, A. McCartney, I. De Santo, E. Risi et al. // Cancer Treat Rev. – 2019. – Vol. 24. – P. 29 – 34.
- 171.** Rugo H. Endocrine therapy for hormone receptorpositive metastatic breast cancer: American Society of Clinical Oncology Guideline / H. Rugo, R. Rumble, E. Macrae, D. Barton et al. // J Clin Oncol. – 2016. – Vol. 34. – P. 3069 – 103.
- 172.** Russnes H. Breast cancer molecular stratification: From intrinsic subtypes to integrative clusters / H. Russnes, O. Lingjaerde, A. Borresen-Dale, C. Caldas // Am. J. Pathol. – 2017. – Vol.187. – 2152 – 2162.
- 173.** Sato K. Prognostic significance of the progesterone receptor status in Ki67-high and -low Luminal B-like HER2-negative breast cancers / K. Sato, M. Miyashita, T. Ishida, A. Suzuki et al. // Ann Oncol. – 2013. – Vol. 24 (3). – P. 661 – 668.
- 174.** Sauter E. Reliable Biomarkers to Identify New and Recurrent Cancer / E. Sauter // Eur J Breast Health. – 2017. – Vol. 13. – P. 162 – 167.
- 175.** Schick M. Pathogenesis and therapeutic targeting of aberrant MYC expression in haematological cancers / M. Schick, Habringer, J. Nilsson, U. Keller // Br J Haematol. – 2017. – Vol.179 (5). – P. 724 – 738.
- 176.** Sestak I. Prediction of late distant recurrence after 5 years of endocrine treatment: a combined analysis of patients from the Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group 8 and arimidex, tamoxifen alone or in combination randomized trials using the PAM50 risk of recurrence score / I. Sestak, J. Cuzick, M. Dowsett, E. Lopez-Knowles et al. // J Clin Oncol. – 2015. – Vol. 33. – P. 916 – 922.
- 177.** Setyawati Y. The Association between Molecular Subtypes of Breast Cancer with Histological Grade and Node Metastases in Indonesian Woman / Y. Setyawati, Y. Rahmawati, I. Widodo, A. Ghozali et al. // Asian Pac J Cancer Prev. – 2018 – Vol. 19 (5). – P. 1263 – 1268.

- 178.** Shandiz F.H. Fluorescent in Situ Hybridization and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction to Evaluate HER-2/neu Status in Breast Cancer / F.H. Shandiz, Fani A., Shakeri S., Sheikhi M. et al. // Iranian Journal of Pathology. – 2017. – Vol. 12 (1). – P. 67 – 73.
- 179.** Sharma A. The prostate metastasis suppressor gene NDRG1 differentially regulates cell motility and invasion / A. Sharma, J. Mendonca, J. Ying, H. Kim et al. // Mol Oncol. – 2017. – Vol. 11 (6). – P. 655 – 669.
- 180.** Sharma P. Pathological Response and Survival in Triple-Negative Breast Cancer Following Neoadjuvant Carboplatin plus Docetaxel // P. Sharma, S. López-Tarruella, J. García-Saenz, Q. Khan et al. // Clin Cancer Res. – 2018. – Vol. 24 (23). – P. 5820 – 5829.
- 181.** Shigematsu M. Dumbbell-PCR for Discriminative Quantification of a Small RNA Variant / M. Shigematsu, S. Honda, Y. Kirino // Methods Mol Biol. – 2018. – Vol. 1680. – P. 65 – 73.
- 182.** Siegel R. Cancer statistics / R. Siegel, K. Miller, A. Jemal. // CA Cancer J Clin. – 2015 – Vol. 65. – P. 5 – 29.
- 183.** Smith C. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology / C. Smith, A. Osborn // FEMS Microbiol Ecol. – 2009. – Vol. 67 (1). – P. 6 – 20.
- 184.** Song T. The method for breast cancer grade prediction and pathway analysis based on improved multiple kernel learning // T. Song, Y. Wang, W. Du, S. Cao et al. // J Bioinform Comput Biol. – 2017. – Vol.15 (1). – P. 1650037.
- 185.** Sørlie T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / T. Sørlie, C. Perou, R. Tibshirani, T. Aas et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2001. – Vol. 98 (19). – P. 10869 – 10874.
- 186.** Sorokin M. RNA Sequencing in Comparison to Immunohistochemistry for Measuring Cancer Biomarkers in Breast Cancer and Lung Cancer Specimens / M. Sorokin, K. Ignatev, E. Poddubskaya, U. Vladimirova et al. // Biomedicines. – 2020. – Vol. 8 (5). – P. 114.

- 187.** Springer J. Genus- and Species-Specific PCR Detection Methods / J. Springer, J. Löffler // *Methods Mol Biol.* – 2017. – Vol. 1508. – P. 267 – 279.
- 188.** Stathopoulos G. The role of Ki-67 in the proliferation and prognosis of breast cancer molecular classification subtypes / G. Stathopoulos, N. Malamos, C. Markopoulos, A. Polychronis et al. // *Anticancer Drugs.* – 2014. – Vol. 25. – P. 950 – 957.
- 189.** Steger G. Management of HER2-Positive Early Breast Cancer / G. Steger, D. Lüftner, H. Stöger, B. Thürlimann et al. // *Breast Care (Basel).* – 2018. - Vol. 13 (6). – P. 453 – 455.
- 190.** Suaifan G. Proteinases as Biomarkers in Breast Cancer Prognosis and Diagnosis / G. Suaifan, D. Jaber, M. Shehadeh, M. Zourob // *Mini Rev Med Chem.* – 2017. – Vol.17 (7). – P. 583 – 592.
- 191.** Tang C. BIRC5 is a novel target of peroxisome proliferator-activated receptor γ in brain microvascular endothelium cells during cerebral ischemia / C. Tang, X. Yang, Q. Zeng, H. He et al. // *Mol Med Rep.* – 2017. – Vol. 16 (6). – P. 8882 – 8890.
- 192.** Tang C. Generation of a Bag1 homozygous knockout mouse embryonic stem cell line using CRISPR/Cas9 / C. Tang, L. Shan, W. Wang, G. Lu et al. // *Stem Cell Res.* – 2017. – Vol. 21. – P. 29 – 31.
- 193.** Tecalco-Cruz, A. Mechanisms that Increase Stability of Estrogen Receptor Alpha in Breast Cancer / J. Ramírez-Jarquín // *Clin Breast Cancer.* – 2017. – Vol. 17 (1). – P. 1 – 10.
- 194.** Thomas C. Estrogen receptor mutations and functional consequences for breast cancer / C. Thomas, J. Gustafsson // *Trends Endocrinol Metab.* – 2015. – Vol. 26 (9). – P. 467 – 476.
- 195.** Tokarz P. All-Trans Retinoic Acid Modulates DNA Damage Response and the Expression of the VEGF-A and MKI67 Genes in ARPE-19 Cells Subjected to Oxidative Stress / P. Tokarz, A. Piastowska-Ciesielska, R. Kaarniranta, J. Blasiak // *Int J Mol Sci.* – 2016. – Vol. 17 (6). – P. 898.

- 196.** Toy W. Activating *ESR1* Mutations Differentially Affect the Efficacy of ER Antagonists // H. Weir, P. Razavi, M. Lawson et al. // *Cancer Discov.* – 2017. – Vol. 7 (3). – P. 277 – 287.
- 197.** Truin W. Estrogen and progesterone receptor expression levels do not differ between lobular and ductal carcinoma in patients with hormone receptor-positive tumors / W. Truin, R. Roumen, S. Siesling, K. van de Vijver et al. // *Breast Cancer Res Treat.* – 2017. – Vol.164 (1). – P. 133 – 138.
- 198.** Tvrdík L. Comparison of the IHC, FISH, SISH and qPCR methods for the molecular diagnosis of breast cancer / L. Tvrdik, Staněk H., Skálová P., Dundr Z., Velenská C. // *Molecular Medicine Reports.* – 2012. – 6 (2). – P. 439 – 443.
- 199.** Ueno T. Progesterone receptor expression in proliferating cancer cells of hormone-receptor-positive breast cancer / T. Ueno, S. Saji, T. Chiba, H. Kamma et al. // *Tumour Biol.* – 2018. – Vol. 40 (10). – P. 1 – 10.
- 200.** Ursaru M. Bilateral breast cancer diagnosis and prognosis // L. Jari, A. Gheorghe, G. Naum et al. – 2016. – Vol.120 (2). – P. 316 – 320.
- 201.** van Poznak C. Use of biomarkers to guide decisions on systemic therapy for women with metastatic breast cancer: ASCO clinical practice guideline / C. van Poznak, L. Harris, M. Somerfield // *J Oncol Practice.* – 2015. – Vol. 11. – P. 514 – 517.
- 202.** Venkateswaran N. MYC leads the way / N. Venkateswaran, M. Conacci-Sorrell // *Small GTPases.* – 2017. Vol. 25. – P. 1 – 9.
- 203.** Vishnoi N. Single-cell, single-mRNA analysis of *Ccnb1* promoter regulation / N. Vishnoi, J. Yao // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7 (1). – P. 2065.
- 204.** Vogler M. Targeting anti-apoptotic BCL2 family proteins in haematological malignancies - from pathogenesis to treatment / M. Vogler, H. Walter, M. Dyer // *Br J Haematol.* – 2017. –Vol. 178 (3). – P. 364 – 379.

- 205.** Waks A. Breast Cancer Treatment: A Review / A. Waks, E. Winer // JAMA. – 2019. – Vol. 321 (3). – P. 288 – 300.
- 206.** Wallden B. Development and verification of the PAM50-based Prosigna breast cancer gene signature assay / B. Wallen, J. Storhoff, T. Nielsen, N. Dowidar et al. // BMC Medical Genomics. – 2015. – Vol. 8. – P. 54.
- 207.** Wang D. Molecular markers progress of breast cancer treatment efficacy / D. Wang, J. Xu, G. Shi, G. Yin // J Cancer Res Ther. – 2015. – Suppl.1. – P. 11 – 15.
- 208.** Wang W. Breast Cancers Found with Digital Breast Tomosynthesis: A Comparison of Pathology and Histologic Grade / W. Wang, L. Hardesty, J. Borgstede, J. Takahashi et al. // Breast J. – 2016. – Vol.22 (6). – P. 651 – 656.
- 209.** Weaver O. Biomarkers and Imaging of Breast Cancer / O. Weaver, J. Leung // AJR Am J Roentgenol. – 2018. – Vol. 210 (2). – P. 271 – 278.
- 210.** Weigelt B. Histological types of breast cancer: how special are they? // F. Geyer, J. Reis-Filho // Mol Oncol. – 2010. – Vol.4 (3). – P. 192 – 208.
- 211.** Weigelt B. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? // J. Reis-Filho // Nat Rev Clin Oncol. – 2009. – Vol.6 (12). – P. 718 – 730.
- 212.** Williams A. Differences in race, molecular and tumor characteristics among women diagnosed with invasive ductal and lobular breast carcinomas / A. Williams, K. Hoadley, H. Nichols, J. Geradts et al. // Cancer Causes Control. – 2019. – Vol. 30 (1). – P. 31 – 39.
- 213.** Wong C. CTSL2 is a pro-apoptotic target of E2F1 and a modulator of histone deacetylase inhibitor and DNA damage-induced apoptosis / C. Wong, Z. Wu, Q. Yu // Oncogene. – 2014. – Vol. 33 (10). – P. 1249 – 1257.
- 214.** Wong N. Primary medical therapy and breast conservation treatment: the medical oncology perspective / N. Wong // Gland Surg. – 2018. – Vol. 7 (6). – P. 560 – 575.
- 215.** Wong S. Population-Based Analysis of Breast Cancer Incidence and Survival Outcomes in Women Diagnosed with Lobular Carcinoma In Situ / S. Wong, T. King,

J. Boileau, W. Barry et al. // *Ann Surg Oncol.* – 2017. – Vol. 24 (9). – P. 2509 – 2517.

216. Xie M. The association between CCND1 G870A polymorphism and colorectal cancer risk: A meta-analysis / M. Xie, F. Zhao, X. Zou, S. Jin et al. // *Medicine (Baltimore).* – 2017. – Vol. 96 (42). – P. 8269.

217. Yang C. Genome-Wide Association Study of MKI67 Expression and its Clinical Implications in HBV-Related Hepatocellular Carcinoma in Southern China / C. Yang, T. Yu, C. Han, W. Qin et al. // *Cell Physiol Biochem.* – 2017. – Vol.42 (4). – P. 1342 – 1357.

218. Yang X. C-terminal binding protein-2 promotes cell proliferation and migration in breast cancer via suppression of p16INK4A / X. Yang, Y. Sun, H. Li, Y. Shao et.al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8 (16). – P. 26154 – 26168.

219. Yip C. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer / C. Yip, A. Rhodes // *Future Oncol.* – 2014. – Vol.10 (14). – P. 2293 – 2301.

220. Yoshida A. Change in HER2 status after neoadjuvant chemotherapy and the prognostic impact in patients with primary breast cancer / A. Yoshida, N. Hayashi, K. Suzuki, M. Takimoto et al. // *J Surg Oncol.* – 2017. – Vol.116 (8). – P.1021 – 1028.

221. Yuryev A. PCR primer design using statistical modeling // *Methods Mol Biol.* – 2007. – Vol. 402. – P. 93 – 104.

222. Yu R. Clinicopathologic features and prognostic implications of MYBL2 protein expression in pancreatic ductal adenocarcinoma / R. Yu, C. Li, X. Lin, Q. Chen et al. // *Pathol Res Pract.* – 2017. – Vol. 213 (8). – P. 964 – 968.

223. Zardavas D. Clinical management of breast cancer heterogeneity / D. Zardavas, A. Irrthum, C. Swanton, M. Piccart // *Nat Rev Clin Oncol.* – 2015. – Vol. 12 (7). – P. 381 – 394.

224. Zhao C. Outcomes and prognostic factors for surgically treated patients with breast cancer spine metastases / C. Zhao, Z. Zhang, N. Zhong, T. Fan et al. // *J Bone Oncol.* – 2018. – Vol. 12. – P. 38 – 43.

- 225.** Zheng Y. Role of estrogen receptor in breast cancer cell gene expression / Y. Zheng, X. Shao, Y. Huang, L. Shi et al. // *Mol Med Rep.* – 2016. – Vol.13 (5). – P. 4046 – 4050.
- 226.** Zhou L. Progesterone suppresses triple-negative breast cancer growth and metastasis to the brain via membrane progesterone receptor α / L. Zhou, W. Zhou, H. Zhang, Y. Hu et al. // *Int J Mol Med.* – 2017. – Vol. 40 (3). – P. 755 – 761.
- 227.** Zolotovskaia M.A. RNA Sequencing in Comparison to Immunohistochemistry for Measuring Cancer Biomarkers in Breast Cancer and Lung Cancer Specimens / M.A. Zolotovskaia, M.I. Sorokin, S.A. Roumiantsev, N.M. Borisov, A.A. Buzdin // *Front. Oncol.* – 2018. – Vol. 8. – P. 658