

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научный центр рентгенорадиологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

КУДИНОВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В
ОПТИМИЗАЦИИ ДИАГНОСТИКИ И ПРОГНОЗА ЗАБОЛЕВАНИЙ
МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.01.12 онкология

**Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

**Научный консультант
академик РАН, профессор
Солодкий Владимир Алексеевич**

Москва-2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)	17
1.1 Современная концепция канцерогенеза. Изменения молекулярно-генетических характеристик при РМЖ, стадийность процесса.....	17
1.2 Сравнение спорадического и наследственного рака молочной железы	19
1.3 Молекулярно-генетические изменения при заболеваниях молочной железы .	23
1.3.1 Тканеспецифические гены молочной железы.....	23
1.3.2 Функциональная роль основных генов канцерогенеза РМЖ.....	29
1.4 Возникновение понятия о молекулярных фенотипах опухоли. Место молекулярного фенотипа в современной классификации РМЖ.....	42
1.5 Примеры клинического применения прогностических индексов на основе анализа экспрессии генов	54
1.6 Перспективы развития молекулярно-генетических технологий в диагностике и прогнозе рака молочной железы.....	62
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	66
2.1 Объект и дизайн исследования. Критерии включения и исключения, формирование групп	66
2.1.1 Дизайн исследования и описание групп	66
2.1.2 Критерии включения и исключения, формирование групп	69
2.1.3 Клинико-морфологическая характеристика пациентов.....	70
2.2 Методы исследования.....	81
2.2.1 Анализ уровня экспрессии генов методом РВ-ПЦР в операционном материале ткани молочной железы.....	81
2.2.2 Методы выделения и постановки реакции ОТ-ПЦР для парафинизированных тканей.....	86
2.2.3 Определение критериев отбора нормальной (морфологически неизменной) ткани молочной железы, как референтного стандарта	90

2.2.4	Разработка методики обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции с использованием специально разработанных праймеров, адаптированных к характеристикам мРНК, выделяемой из парафинизированной ткани.....	92
2.2.5	Анализ мРНК в образцах крови.....	94
2.3	Статистическая обработка.....	96
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ).....		
3.1	Анализ уровня экспрессии генов в зависимости от типа ткани.....	102
3.1.1	Сравнение морфологически неизменной ткани (НТ) и ткани рака молочной железы (РМЖ)	102
3.1.2	Определение оптимальной панели биомаркеров для диагностики и прогноза заболеваний молочной железы. Алгоритм применения полученной панели генов при обследовании пациенток с патологией молочной железы.	113
3.2	Анализ уровня экспрессии генов в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли рака молочной железы.....	119
3.2.1	Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от морфологической характеристики опухоли.....	120
3.2.2	Анализ экспрессии генов в зависимости от размеров опухоли (показатель Т по классификации TNM)	121
3.2.3	Анализ экспрессии генов в зависимости от наличия метастатических лимфоузлов (показатель N по классификации TNM)	121
3.2.4	Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от статуса рецепторов	123
3.2.5	Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от степени злокачественности.....	125
3.3	Проверка надежности полученных результатов на расширенной группе	127
3.4	Взаимосвязь экспрессии мРНК маммаглобина с клинико-морфологическими особенностями патологии молочных желез	133

3.4.1 Исследование экспрессии мРНК маммаглобина в образцах тканей молочной железы	133
3.4.2 Исследование экспрессии мРНК маммаглобина в крови	145
3.5 Сравнительная оценка моделей определения фенотипа опухоли с использованием расширенной панели экспрессии генов и панели классических маркеров, определяемых методом ИГХ при РМЖ.....	148
3.5.1 Модель фенотипирования РМЖ на основе анализа профиля экспрессии генов.....	150
3.5.3 Отличия уровней экспрессии генов, не включенных в «суррогатный» ИГХ метод в выявленных фенотипах и анализ безрецидивной выживаемости.....	167
3.5.4 Оценка воспроизводимости фенотипирования с использованием редуцированной модели и сравнительный анализ выживаемости	170
3.5.5 Проспективный анализ эффективности определения молекулярного фенотипа РМЖ	174
3.5.6 Прогноз рецидивирования на основании математической модели, включающей профиль экспрессии генов в ткани опухоли.....	177
3.5.7 Разработка математической модели определения риска локо-регионального рецидивирования (ЛРР) у пациенток с РМЖ при радикальной резекции	18888
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	1967
4.1 Место молекулярно-генетического метода в комплексной диагностике РМЖ	1967
4.2 Перспективы использования молекулярно-генетических технологий в диагностике и прогнозе заболеваний молочной железы	20909
4.3 Гетерогенность ткани РМЖ и методы ее оценки	2122
ВЫВОДЫ	2233
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	2255
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	2277
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	22929
ПРИЛОЖЕНИЕ	2733

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Рак молочной железы (РМЖ) является одним из самых распространенных онкологических заболеваний у женщин. Заболеваемость раком молочной железы, неуклонно растет и занимает первое место (19,8%) среди онкологических заболеваний женщин. Данное заболевание также лидирует как причина смертности от злокачественных новообразований у женщин и составляет 17,1%, обуславливая основную долю онкологической смертности в возрастных группах 40—69 лет, 85 лет и старше. Отмечается также рост заболеваемости и гиперпластическими процессами молочной железы, в т.ч. в возрастной группе до 30 лет. В течение последних 20 лет уровень заболеваемости РМЖ в России вырос почти в 1,5 раза, смертность увеличилась на 25 % (А.Д. Каприн, 2016). Одной из основных проблем остается позднее выявление заболевания. Более 30 % опухолей диагностируется на III-IV стадии (Давыдов М.И., 2014). Хотя, безусловно, следует отметить, что эти результаты намного опережают показатели выявляемости других онкологических заболеваний. Эффективная и экономически рациональная система обследования молочных желез интегрирует современные методы лучевой диагностики – рентгенографии, ультразвукового исследования с доплерографией, магнитно-резонансной томографией. Это позволяет увеличить выявляемость ранних стадий заболевания (Чиссов В.И., Солодкий В.А. 2013).

Однако необходимо отметить, что считающаяся в настоящее время золотым стандартом ранней диагностики тактика сочетания лучевых методов и морфологического исследования материала биопсии не всегда является адекватной для точной верификации диагноза. При наличии определенных диагностических признаков, таких как, скопление микрокальцинатов, наличие эндофитного компонента внутри кисты, изменение плотности и контуров образования при динамическом наблюдении, полностью исключить злокачественный характер образования не удастся (Каприн А.Д., Рожкова Н.И., 2016). Ряд авторов рекомендуют выполнение секторальной резекции молочной железы с морфологическим исследованием, если в материале тонкоигольной

биопсии обнаружена атипичная гиперплазия (Peasgood T, 2010; Conner-Spady BL, 2005). По данным исследований в 20% таких случаев обнаруживается инвазивный рак. Также недостаточное качество маммографических снимков приводит к увеличению количества биопсий на 19,7 %, что само по себе является фактором риска развития рака молочной железы (Levitan D., 2011).

Таким образом, в ряде случаев низкая эффективность методов лучевой и морфологической диагностики реализуется или в многократном повторении маммографического исследования с биопсией, или заканчивается хирургическим лечением, как правило, в объеме секторальной резекции со срочным гистологическим исследованием. Именно для данной категории больных анализ биологических маркеров рака молочной железы является крайне актуальной задачей, т.к. в основе исследования лежит оценка молекулярно-генетических признаков малигнизации, имеющих высокий уровень специфичности и чувствительности.

Важным направлением внедрения новых методов диагностики, основанных на молекулярно-генетическом подходе является создание новых систем дифференциальной диагностики и выделения неблагоприятных прогностических групп.

На протяжении ряда десятилетий, классическая классификация РМЖ базировалась на гистологических принципах. Было разработано несколько систем классификации (Guiu S., 2012, Weigelt B., 2009). В 2003 году Всемирная организация здравоохранения выделила 18 различных гистологических подтипов инвазивного РМЖ. Однако, критерии для выделения этих подтипов были скорее субъективные и информация о гистологическом подтипе имела ограниченное применение для принятия использования в терапевтической практике (Ellis P., 2003).

Поэтому текущая стратификация РМЖ на клинически значимые подгруппы включает кроме традиционных клиничко-патологических параметров: гистологический тип, наличие метастазов в лимфоузлы и лимфо-васкулярную инвазию, такие прогностические биомаркеры как экспрессия рецепторов

эстрогенов и прогестеронов, а также статус HER2 для которых была доказана их высокая клиническая значимость (Davies C., 2011, Yin W., 2011, Hammond M. E., 2010).

В течение последнего десятилетия исследования экспрессии генов с применением технологии полногеномного экспрессионного анализа на микрочипах привели к пониманию того факта, что РМЖ составляет гетерогенную группу заболеваний, имеющих различные молекулярные свойства. Вначале было выделено 4 подгруппы: базальный, HER2-позитивный, люминальный и normal breast-like (Perou C.M., 2000). Важно, что было доказано, что получаемые результаты стратификации на молекулярные подтипы не зависят от используемых методов исследования (различных способов оценки уровня экспрессии выделенного комплекса прогностических генов) (Guiu S., 2012; Sorlie T., 2003.)

Дальнейшие исследования позволили выявить новые, клинически значимые, подтипы. Было показано, что большая часть базально-клеточного рака (>80%) является тройным негативным раком, а люминальный подтип может быть разделен на два (люминальный А и В), на основании уровня экспрессии генов, характеризующих активность пролиферации, например Ki67 (Cheang M.C., 2009; Curtis C., 2012, Herschkowitz J.I., 2007, Parker J.S., 2009, Prat A., 2010, Farmer P., 2005, Guedj M., 2012). Важным успехом для внедрения результатов молекулярной стратификации стала разработка методов классификации для конкретных данных пациента/образца ткани (single sample predictors (SSPs)), т.к. используемые до этого времени методы иерархической классификации этого не позволяли (Sorlie T., 2003). В 2011 году подтипы РМЖ основанные на анализе экспрессии генов были включены в международное соглашение 2011 г. - St Gallen International Expert Consensus и была предложена классификация на основе оценки уровня экспрессии с использованием методов ИГХ (Goldhirsch A., 2011).

В последнее время методы молекулярного прогноза\диагностики были усовершенствованы и переведены с платформы микрочипов на платформу анализа экспрессии генов методом количественного ПЦР (например, метод PAM50) (Parker J.S., 2009). Следует подчеркнуть, что имеется много данных,

говорящих за то, что молекулярный фенотип, определяемый методом ИГХ (получившим также наименование «суррогатного» метода) и методами анализа экспрессии генов имеют большие расхождения. Так, например, по данным разных авторов от 31 до 59% HER2 позитивного рака по данным ИГХ и метода *in situ* hybridisation (ISH) классифицируются в другие подтипы (Sorlie T., 2003; Prat A., 2010; Weigelt B. 2010, de Ronde J.J., 2010, . Parker J.S, 2009, Vogelstein B., 2013, Allott E.H., 2016).

Важным практическим приложением результатов анализа экспрессионных профилей ткани РМЖ является построение прогностических моделей для конкретных групп пациентов. Так, например, после хирургического лечения для больных РМЖ I-II стадии в случае эстроген-позитивного и HER2-негативного фенотипа опухоли стандартом адъювантной терапии является гормонотерапия в сочетании с лучевой и химиотерапией при наличии показаний. Выбор тактики терапии осуществляется на основании рекомендаций российских и международных клинических руководств (Adjuvant! Online, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology™ Breast Cancer (Version 1.2011)). Тем не менее, традиционные клиничко-морфологические характеристики заболевания, такие как размер первичной опухоли, характер местного распространения, степень злокачественности и др. не всегда способны обеспечить необходимую прецизионность выбора терапии (Dignam J.J., 2009). Подобная ситуация диктует необходимость создания диагностического инструмента, способного на основе многопараметрической оценки клиничко-морфологических и фенотипических особенностей РМЖ обеспечить адекватный выбор адъювантной терапии, в особенности у пациентов, для которых сочетание классических факторов прогноза невозможно трактовать однозначно, то есть, на основании про/ретроспективной оценки выделить группу пациентов, которым, несмотря на благоприятное сочетание факторов прогноза, показано проведение адъювантной химиотерапии, а также пациентов, не нуждающихся в дополнительном цитостатическом лечении несмотря на неблагоприятное сочетание "классических" факторов прогноза (Goldhirsch A., 2013, Семиглазов В.Ф., 2012, Mertins P., 2016).

В связи с тем, что используемые в настоящее время в клинике прогностические модели формируют достаточно гетерогенную группу больных в отношении риска прогрессирования, достаточно трудно оценить эффективность отдельных видов терапии. В частности, влияние адьювантной химиотерапии на десятилетнюю выживаемость без прогрессирования у больных с отсутствием метастазов в регионарные лимфоузлы (N0), оценивается как низкое (абсолютный эффект составляет 4%) (Fisher B., 2004, Gligorov J., 2015), одновременно, приблизительно 50% больных ранним РМЖ (I-II стадия заболевания) получают адьювантную химиотерапию (АХТ), которая характеризуется выраженными токсическими эффектами, что в значительной степени снижает качество жизни (Gnanta M., 2011, Nielsen T.O., 2012; Goldhirsch A., 2011).

Согласно результатам исследований NSABPB-14, B-20 проведение послеоперационной химиотерапии и эндокринотерапии повышает как общую, так и безрецидивную выживаемость больных раком молочной железы в случае эстроген-положительного фенотипа опухоли. Однако отдаленные метастазы в течение 10 лет при проведении эндокринотерапии развиваются только у 35% больных (Paik S., 2006; Wang Y., 2005). Таким образом, проведение химиотерапии остальным 65% больных не отразится ни на общей, ни на безрецидивной выживаемости. Значительное количество клинических наблюдений и данных о биологической гетерогенности опухоли свидетельствуют о том, что пациенты отвечают по-разному на адьювантную терапию. Например, обзоры рандомизированных исследований свидетельствуют, что терапевтический эффект химиотерапии значительно выражен у молодых женщин (Sorlie T., 2001, Brenton J.D, 2005, Sorlie T 2003; Parker J.S., 2009). Мировыми экспертами признается недостаточность существующих морфо-молекулярных маркеров и показаний к назначению цитотоксической терапии (Hassett M.J., 2012; Chang J.C., 2003, Рожкова Н.И., 2014). Поэтому подбор правильного алгоритма терапии при лечении рака молочной железы является актуальной задачей.

Введение в клиническую практику более точных критериев оценки вероятности отдаленного метастазирования у больных РМЖ позволит с большей

достоверностью выделить группу больных, которым необходима адъювантная химиотерапия (Muss H.B, 2009). В настоящее время наиболее перспективным и научно обоснованным является создание алгоритмов расчета риска отдаленного метастазирования на основании количественной оценки профиля экспрессии генов, отражающих активность ключевых клеточных процессов, вовлеченных в процессы канцерогенеза и опухолевую прогрессию: пролиферации, апоптоза, свойства клеточной миграции и адгезивности и др. Поэтому разработка такой технологии является актуальной научно-практической задачей.

Фенотипическая гетерогенность рака молочной железы на сегодняшний день не оставляет сомнений (Sotiriou C., 2009; Jalava P., 2006; Goldhirsch A., 2009). В таблице 1 приведены критерии, используемые в настоящее время для выбора объема адъювантной терапии у больных рецептор-позитивным РМЖ.

Таблица 1 — Рекомендации панели экспертов St. Gallen по верификации и фенотипа РМЖ и выбору адъювантной терапии

Биологический тип	Морфологические критерии	Схема терапии
Люминальный тип А	- EEP/ПР положительный - HER2 отрицательный - Ki 67 менее 20%	низкий RS на основе МП ЭТ ± ХТ
Люминальный тип В (HER2 отрицательный)	- HER2 отрицательный - Высокий Ki 67 - ПР отрицательный/низкий	высокий RS на основе МП ЭТ ± ХТ
ЭТ - эндокринотерапия; ХТ - химиотерапия		

Понимание патогенетических механизмов канцерогенеза при РМЖ позволяет определить вектор планируемой терапии, путем воздействия на ключевые элементы функциональной активности клетки: использование

гормонотерапии в случае экспрессии клетками опухоли рецепторов стероидных гормонов и дополнение ее цитостатической химиотерапией при высокой пролиферативной активности. Однако, подобный подход не обеспечивает достаточной прецизионности для индивидуализации терапии. В частности, иммуногистохимические критерии, принятые для стратификации молекулярного подтипа, не всеми экспертами рассматриваются как объективные. Уровень иммуногистохимической оценки экспрессии Ki67 для люминального подтипа В был пересмотрен с 14% до 20% (Jalava P., 2006), что свидетельствует об отсутствии достаточной точности выбранных критериев для оценки прогноза безрецидивной выживаемости РМЖ и, соответственно, решения вопроса о назначении адъювантной химиотерапии.

В случае люминальных подтипов А и В рекомендации в пользу назначения АПХТ являются достаточно условными (Olivotto I.A., 2008). Это, вероятно, также является следствием недостаточной прецизионности используемых маркеров. Решением этой проблемы может быть использование экспрессионных панелей для стратификации риска (Muss H.V., 2009).

Цель исследования

Изучение диагностической и прогностической значимости молекулярно-генетического исследования профиля экспрессии генов при заболеваниях молочной железы.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Исследовать тканеспецифичность и особенность экспрессии мРНК маркера - маммаглобина в нормальной, опухолевой ткани и периферической крови при злокачественных и доброкачественных заболеваниях молочной железы.
2. Исследовать зависимость экспрессии профиля генов в ткани рака молочной железы от клинико-морфологических характеристик опухоли.
3. Выявить диагностически значимые молекулярно-генетические маркеры для дифференциальной диагностики доброкачественных и злокачественных новообразований молочной железы.

4. Оптимизировать методику исследования профиля экспрессии генов в парафинизированной ткани рака молочной железы.
5. Провести кластеризацию данных профиля экспрессии генов в ткани рака молочной железы и формирование диагностической панели для определения молекулярного фенотипа опухоли.
6. На основе анализа профиля экспрессии генов методом ПЦР разработать алгоритм использования диагностической панели и сравнить результаты определения молекулярных фенотипов методом ПЦР и иммуногистохимического метода, на образцах парафиновых блоков.
7. Разработать алгоритм использования диагностической панели генов для выявления групп высокого риска рецидивирования у больных с нераспространенными формами рака молочной железы (стадии T1-2, N0-2).

Научная новизна

В ходе выполнения диссертационной работы получены оригинальные результаты, позволяющие оптимизировать молекулярно-генетические методы для диагностики и прогноза заболеваний молочной железы.

Впервые методом ПЦР в реальном времени исследована большая панель экспрессии генов – ключевых регуляторов основных клеточных процессов участвующих в канцерогенезе и прогрессии опухоли. Проведена оценка уровней экспрессии большого количества генов в патологической ткани (доброкачественные и злокачественные новообразования) и окружающей ткани молочной железы – органа, в котором локализуется патологический процесс.

На основании проведенных молекулярно-биологических исследований образцов ткани молочной железы, показано, что спектр генов, включающий определение уровня экспрессии: Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1, позволяет с высокой достоверностью отличить доброкачественную и злокачественную ткань молочной железы в случаях, когда постановка диагноза клиничко-радиологическими методами затруднена. Включение этих исследований в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики.

Показано, что органоспецифический маркер – маммаглобин, гиперэкспрессирован в ткани опухоли на ранних стадиях. Исследование мРНК маммаглобина в периферической крови показало высокую диагностическую чувствительность (до 70%) именно для ранних стадий РМЖ.

Разработан оригинальный метод определения молекулярного фенотипа РМЖ на основании исследования профиля экспрессии генов методом РВ-ПЦР в ткани опухоли, а также эффективный алгоритм выявления неблагоприятных групп прогноза, риска рецидивирования и выбора оптимальной схемы терапии для больных ранними формами РМЖ.

Теоретическая и практическая значимость

Разработан метод, включающий определение уровня экспрессии таких генов, как Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1, в образце ткани молочной железы позволяющий с высокой достоверностью отличить доброкачественную и злокачественную ткань молочной железы в случаях, когда постановка диагноза клинико-радиологическими методами затруднена. Включение этих исследований в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики с 81% до 96%.

На основании полученных результатов разработаны проекты методических рекомендаций «Методологические аспекты комплексной диагностики гиперпролиферативных заболеваний молочной железы» предназначенных для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-генетиков и врачей онкологов.

На основании полученных результатов анализа экспрессионного профиля генов, разработаны для производства и внедрения в практику работы клинико-диагностических лабораторий учреждений онкологического профиля и общей лечебной сети, отечественные тест-системы определения и комплексной оценки уровня экспрессии мРНК 24 генов для определения молекулярных фенотипов РМЖ и выявления неблагоприятных групп прогноза и рецидивирования для больных с нераспространенным раком молочной железы.

Предложенный метод диагностики РМЖ на основании определения тканеспецифического маркера маммаглобина в периферической крови может быть рекомендован для ранней диагностики и мониторинга РМЖ.

Разработан алгоритм использования оригинального набора реагентов определения молекулярных фенотипов РМЖ на основе ПЦР метода определения экспрессии комплекса генов в парафиновых блоках.

Методы и методология

Всего в исследование включены 764 пациентки, проходивших лечение в ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России в период с 2000 по 2015 гг, из них для 595 пациенток проведен анализ оценки уровня экспрессии комплекса генов методом ПЦР в реальном времени. Для каждой пациентки были проанализированы образцы как патологической, так и удаленной от опухолевого узла ткани (морфологически неизменной) молочной железы. В большей части образцов была исследована экспрессия 24 генов (21 функциональный и 3 контрольных), что с учетом дублей (все исследования выполнялись в повторах) составило более 50 тысяч ПЦР анализов. Отдельную группу составили 169 пациенток, у которых методом «Nested ПЦР» был определен уровень экспрессии тканеспецифического маркера – маммоглобина в периферической крови. Статистическая обработка включала как комплекс стандартных параметрических и непараметрических методов оценки достоверности отличий, так и большой спектр многопараметрических методов статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту

1. Анализ экспрессии комплекса генов, отвечающих за функционально важные процессы в опухолевой ткани: контроль пролиферации, апоптоз, дифференцировка и клеточное взаимодействие позволяет с высокой достоверностью дифференцировать доброкачественные и злокачественной новообразования молочной железы.

2. Ткань молочной железы в органе, пораженном злокачественной опухолью, имеет отличный профиль экспрессии от ткани молочной железы с доброкачественными новообразованиями. Это может отражать как компенсаторные, локальные противоопухолевые механизмы, так и системные паранеопластические процессы.

3. Тканеспецифический маркер молочной железы - маммаглобин гиперэкспрессирован при ранних стадиях РМЖ. Определение мРНК маммаглобина в периферической крови можно использовать для ранней диагностики РМЖ.

4. На основе анализа экспрессии сформированного профиля генов в ткани РМЖ получены эффективные модели прогноза рецидивирования, что способствует индивидуализации планирования программ лечения при ранних стадиях РМЖ.

5. Использование оптимально подобранных генов, на основании определения их экспрессии методом ПЦР и математического анализа, позволяет сформировать оптимальный алгоритм для определения молекулярного фенотипа РМЖ.

Апробация работы

Материалы работы доложены на 14 конференциях, из которых 4 международные: IV Съезд Научного общества специалистов клинической лабораторной диагностики России. Научно-практическая конференция "Лабораторная наука - практике: первое десятилетие XXI века"- Москва 2010 г., 4th WIN Symposium, WIN 2012 June 28-29, Annals of oncology Paris, France 2012 г., Int.Congress Gynaecology and Obstetrics Guanchou, China 2012 г., «Медицина молочной железы»» 24-26 февр. Москва 2012 г., «Аналитическая надежность и диагностическая значимость лабораторной медицины» 26–28 марта, Москва 2013 г., VIII съезд онкологов и радиологов СНГ и Евразии, 16-18 сентября 2014 г., III Междисциплинарный форум «Медицина молочной железы» Москва 23–24 мая 2014 г, Circulating biomarkers Boston, USA 24-25 March 2014, XVIII Форум «Национальные дни лабораторной медицины России» 1 – 3 октября 2014г.,

«Национальные дни лабораторной медицины России» Москва 23 - 25 сентября 2015 г., XXXI International Congress of the IAP and 28th Congress of the ESP, Cologne, Germany 25 - 29 September 2016.

Апробация работы состоялась на совместном заседании Ученого совета и научно-практической конференции ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России 20 мая 2016 года.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 54 печатных работы, из них: 37 статей в журналах, рекомендованных ВАК, 1 заявка на изобретение, 2 технологии.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 280 страницах, содержит главы введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, практические рекомендации, выводы, список литературы, цитирующий 41 отечественных и 329 зарубежных авторов, 1 приложение. Диссертация иллюстрирована 100 таблицами и 47 рисунками.

Степень достоверности и апробация результатов

Большое число пациентов, включенных в исследование, длительный период наблюдения за больными, анализ исходов лечения, применение современных методов исследования и многопараметрические методы статистического анализа данных делают полученные результаты достоверными. Разработанные в ходе выполнения исследования тест – системы определения молекулярных фенотипов РМЖ и выявления неблагоприятных групп прогноза и рецидивирования проходят регистрацию в Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Разработан проект методических рекомендаций «Методологические аспекты комплексной диагностики гиперпролиферативных заболеваний молочной железы».

ГЛАВА 1. РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ В ДИАГНОСТИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)

1.1 Современная концепция канцерогенеза. Изменения молекулярно-генетических характеристик при РМЖ, стадийность процесса

В настоящее время достаточно быстрое развитие молекулярной онкологии происходит за счет появлению новых технологий. Эти исследования позволяют не только обновлять и уточнять представление о канцерогенезе, но и развивать новые направления для терапии онкологических заболеваний.

Процесс канцерогенеза, схематически, можно представить в виде следующего, условного ряда (рисунок 1,2): 1. Возникновение свойств бессмертности; 2. Гиперплазия I, II, III степени; 3. Возникновение собственно злокачественной опухоли (неоплазия, которая может быть в свою очередь разбита на стадии: карцинома *in situ*, инвазивная карцинома, метастатическая карцинома).

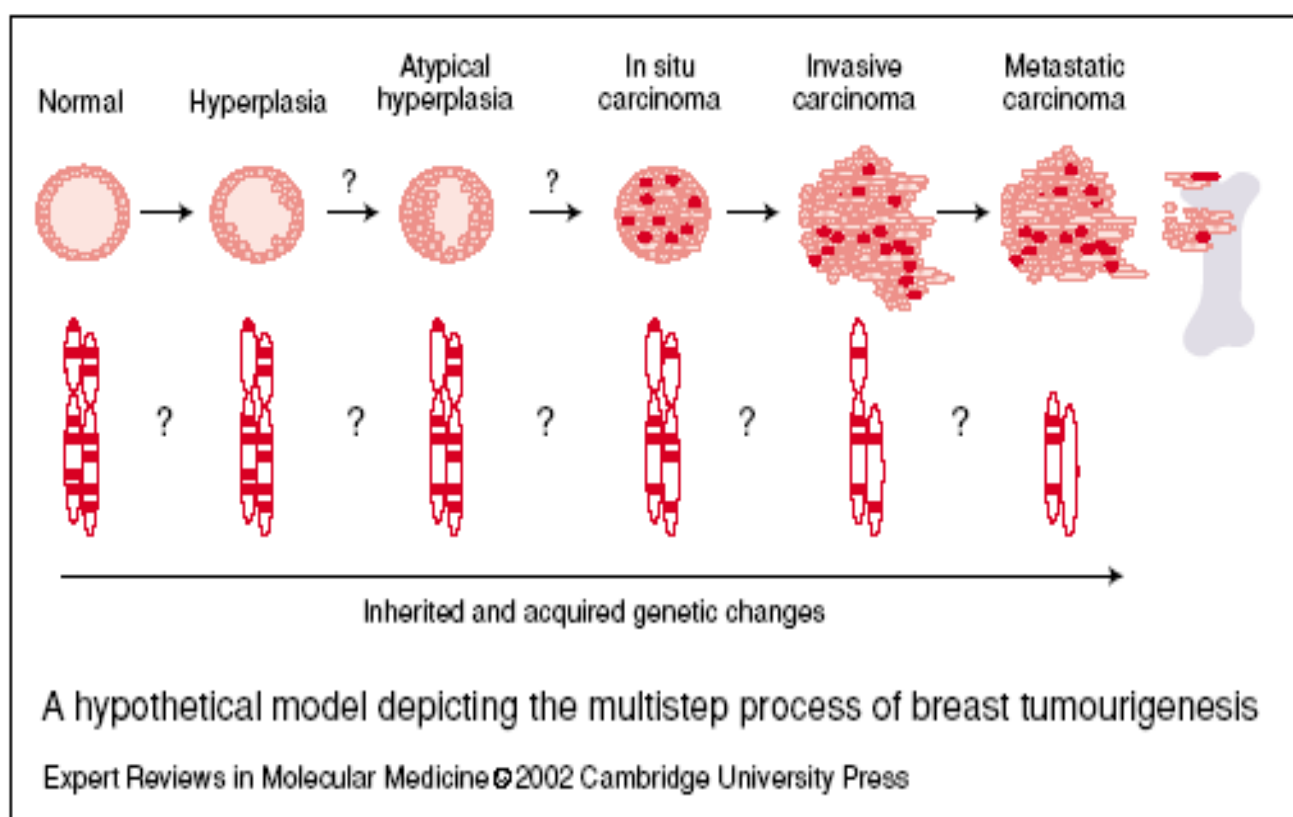


Рисунок 1 — Модель канцерогенеза на клеточном и молекулярном уровне.

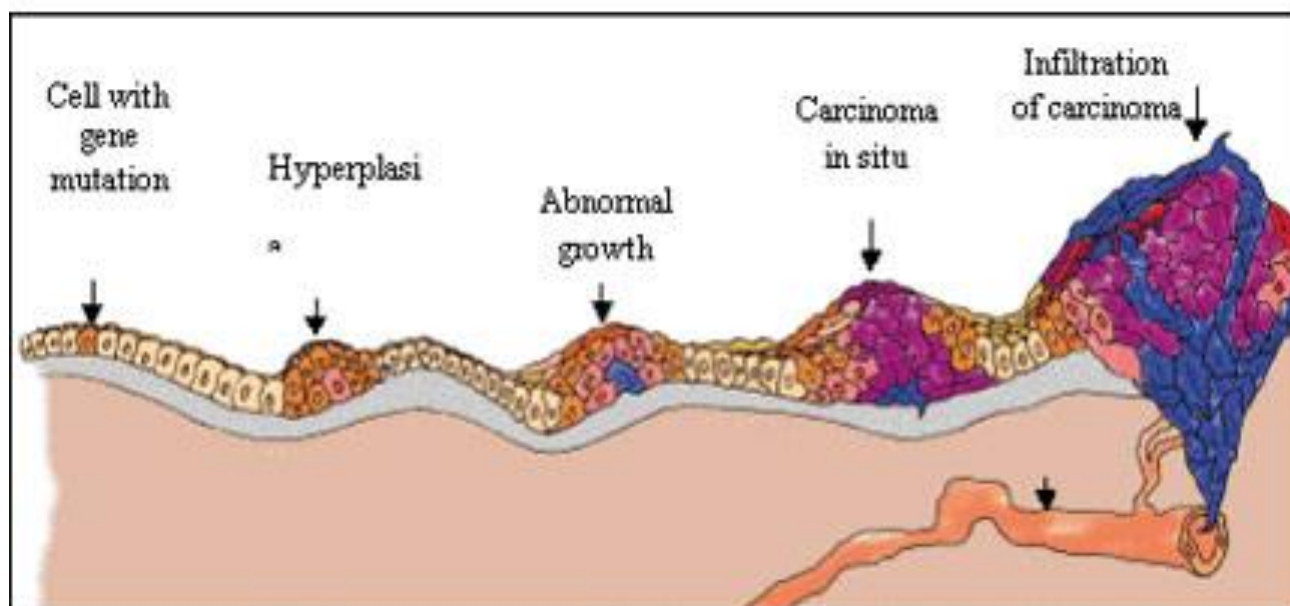


Figure 1. Stages of carcinogenesis occur and development

Рисунок 2 — Гистологическое представление стадий канцерогенеза.

Реализация каждой стадии требует определенных молекулярных изменений. При этом предполагается, что весь процесс требует для своей реализации от 3 и более независимых случайных событий, связанных с генетическими изменениями в клетке (амплификации - увеличение копияности генов), делеции, инсерции, транслокации, микромутации или эпигенетическими изменениями функционирования ряда ключевых белков – регуляторов таких важных внутриклеточных процессов как пролиферация клетки и апоптоза (Merkel DE. 1989, Заридзе Д.Г., 2004, Герштейн, Е.С., 1994).

Одним из классических признаков неоплазий является нарушение регуляции дифференцировки и митотической активности клеток, в связи с чем указанная проблема затрагивается в той или иной форме в разных концепциях. Так, на модели спонтанного рака молочной железы у мышей исследованы молекулярные механизмы, сопровождающие развитие каждой из стадий (Andersen, K., 1998, Cohen, B., 1999). Возникновение свойств неограниченной пролиферации сопровождается: увеличением экспрессии сус B1, сус B1-cdc2, и снижением p21Cip; гиперплазия I – увеличением активности сус D2-cdk4, p27/cdk2 и уменьшением ER/PR и p16 INK4a; гиперплазия II – увеличение сус D2-cdk4; гиперплазия III - появление мутаций генов p53, циклина D2, cdk4/6, p34 и

сопровождается увеличением экспрессии теломеразы TERT, HOX, CD44v8, E6-AP; появление собственно злокачественного фенотипа сопровождается следующими изменениями – увеличением экспрессии: cdc2, cdk2, cdk4, сус D1-cdk4, сус E, C/EBP-B, eIF2 alfa, p96 (Ермоленко А. Е., 2015, Копнин Б.П.,2002, Talmadge, J.E.,2010).

Обнаруженные изменения экспрессии регуляторов различных внутриклеточных процессов при развитии спонтанных опухолей у мышей с высокой степенью вероятности могут соответствовать молекулярным событиям, сопровождающим процессы канцерогенеза у человека (Jones, R.G.,

2009,). Основанием для таких выводов могут служить следующие сравнения (таблица 1.1).

Таблица 1.1 — Сравнение предопухолевых процессов у человека и мыши.

Процесс/маркер	Протоковая гиперплазия, мышь	Протоковая гиперплазия, человек
опухолеродность	Да	Высокая вероятность
ER/PR	Позитивные	Позитивные
Хромосомная стабильность	анеуплоидные	анеуплоидные
Бессмертный фенотип	да	Преимущественно да
теломеразы	Повышенная активность	Повышенная активность
Циклин Д	Повышенная активность	Повышенная активность
P27/Kip1	Повышенная активность	Не известно

1.2 Сравнение спорадического и наследственного рака молочной железы

В настоящее время показано, что наличие мутаций генов BRCA1 или BRCA2 существенно увеличивают вероятность развития рака молочной железы. При этом, в случае гена BRCA1 она оценивается в 80% и более (вероятность развития рака до достижения возраста 70 лет). Интересно, что мутации BRCA1 гена относительно редко встречаются в ткани опухоли при спорадическом раке молочной железы (до 10%) (Skol A.D.,2016, Walsh MF,2016). Можно предположить существование двух вариантов причин такого явления. Первое – механизм возникновения спорадического и наследственного рака отличаются.

Второе – спектр мутаций, при спорадическом раке отличается от спектра мутаций для наследственного рака. Этот вопрос активно исследуется в настоящее время еще и потому, что подобная ситуация наблюдается и для других наследственных форм рака, таких как опухоль Вильмса, наследственный колоректальный рак и др. Во всех случаях, мутации маркерных генов, свойственных для наследственных вариантов, отсутствуют в спорадических формах рака (Zugazagoitia J, 2014, Comen E, 2011, Любченко Л.Н., 2014, Лушникова А.А., 2010).

Таким образом, можно констатировать, что развитие опухоли сопровождается закономерным изменением комплекса молекулярных свойств клеток, приводящих к возникновению опухоли. Эти изменения могут служить источником диагностической и прогностической информации.

В основе наблюдаемых изменений могут лежать различные молекулярные процессы кратко суммированные в таблице 1.2.

Таблица 1.2 — Молекулярные механизмы и мишени при канцерогенезе.

Вид	Механизм	Молекулярные мишени/ маркеры
Генетические повреждения	Хромосомные транслокации, Точковые мутации, Делеции, Альтернативный сплайсинг, Амплификация, Генетическая нестабильность	t(11,22), t(14,18) p53, ras, ER, raf B BRCA1, BRCA2, p16 Muc 1, integrin, erbB-2, c-myc Ras, N-myc микросателлиты
гиперметилирование	Эпигенетические изменения	p16, GSTP1, APC, c-myc, 14-3-3
Вирусная трансформация		MMTV, HPV, HHV-8
Тканеспецифические маркеры м-РНК	Эпигенетические изменения	Muc-18, ароматаза, сус D1
Опухолеспецифические маркеры	-	CA 15-3, KEA, CA 72-4, ТПА

В таблице 1.3 приведены некоторые примеры активирующих и инактивирующих изменений генома в опухолях молочной железы

Таблица 1.3 — Наиболее частые изменения генетического материала, наблюдаемые при раке молочной железы.

Механизм изменения генетического материала	Гены и/или локусы хромосом
Изменения генетического материала, приводящие к повышению активности гена	
Амплификация	<i>MYC, CCND1, EMS1, HER2</i>
Повышение экспрессии генов	<i>BCL2, Cathepsin D, CCNE, hTERT, AURCA, BIRC5, CTSD, GATA3, IGF1R, Ki-67, MDM2, MUC1, MYBL2, neurosin, PAI1, PAI2, POH1, PS2, Rantes, VEGF</i>
Анеуплоидия с увеличением числа копий локусов хромосом	1q (1q21, 1q32, 1q41), 8q (8q24), 11q (11q13), 16p (16p11), 17q (17q11. 2, 17q24), 20q (20q13)
Изменения генетического материала, приводящие к снижению активности гена	
Делеции	1p (1p31–35, 1p36), 6q (6q13–21, 6q21–23. 3, 6q25–27), 8p (8p21, 8p22–23), 11q (11q22–23, 11q24–25), 13q (13q12–13, 13q14. 1), 16q (16q21–23. 3, 16q24. 3), 17p (17p13. 1, 17p13. 3), 22q (22q13)
Мутации, приводящие к изменению кодируемого белка	<i>CDH1, PIK3CA, p53</i>
Метилирование промоторов генов	<i>APC, BRCA1, CCND2, CDH1, CDH13, DAPK, ER, FHIT, GSTP1, HIN1, HOXA5, NES1, NM23-H1, NOEY2, PR, INK4, CIP1, RAR-beta, TGFBR2</i>

Показано, что количество мутаций, видоизмененных генов в геноме при раке молочной железы значительно больше в сравнении с нормальной тканью молочной железы. Больше число мутаций было отмечено в хромосоме 4, хромосоме 15, и хромосоме 18. Тем самым исследования показывают значительные топологические различия в мутациях генов при раке молочной железы и нормальной тканью МЖ (Song X.X.,2016, Suo C.,2015). События, которые инициируют нормальную ткань молочной железы к канцерогенезу остается до конца не выясненными. Поэтому понимание, того, изменение каких ключевых молекулярно-биологических маркеров необходимо оценивать, если есть подозрение на возможную малигнизацию ткани остается предметом изучения и в настоящее время. Следовательно, исследование молекулярно-

генетического профиля нормальной ткани молочной железы и ткани молочной железы при различных патологических состояниях, расцениваемых как «предраковые» является важной задачей. Это может помочь для оценки риска малигнизации при анализе рутинных биопсийных исследованиях молочной железы в случаях с подозрительными УЗИ или сомнительной маммографии, а также развития риска местного рецидива после иссечения опухоли. Кроме того, профиль экспрессии генов нормальной ткани молочной железы может быть использован для оценки процессов взаимодействия опухоль-окружающая ткань (Zubor P., 2015). В работе Tripathi A в 2008 г исследовалась экспрессия генов в нормальной ткани молочной железы у 2 групп пациенток: после удаления рака молочной железы и после редукционной маммопластики. Было показано, что 2/3 исследованных ими генов имели нарушения, характерные для рака молочной железы. Последнее время становится очевидным, что исследование только опухолевой ткани недостаточно для полноценной характеристики процессов канцерогенеза и необходим анализ и окружающей ткани органа, в котором развилась злокачественная опухоль. Это позволяет оценить вклад наследственных и соматических мутаций и локальных тканевых процессов в развитии опухоли (Siân Jones S., 2015, Koboldt DC., 2012).

При этом гетерогенность происходящих изменений, уровни нарушений метаболических процессов требуют использования специализированных методов анализа.

Для определения генетических изменений структуры генома используют методы прямого секвенса, т.е. определения последовательности нуклеотидов в ДНК гена, а также методы, основанные на изменении конформации ДНК зависящие от изменения ее последовательности – SSCP или гетеродуплекса. Используются также различные варианты ПЦР – так называемые сайт специфические ПЦР. В таблице 1.4 суммированы основные отличия различных методов анализа ДНК.

Таблица 1.4 — Сравнение методов анализа изменений структуры ДНК.

Метод	Чувствительность	Отличительные особенности
ПЦР	10^{-18}	Обнаружение только локальных перестроек, высокая специфичность
Гибридизация	10^{-12} - 10^{-14}	Относительно низкая чувствительность
SSCP, гетеродуплекс	1% мутантных молекул	
Сиквенс	?	Обнаружение любого типа нарушений (кроме изменения количества хромосом), низкая чувствительность
FISH	- наличие неповрежденных клеток	Только крупные перестройки, наглядность

Разнообразие методических подходов (фрагментарный анализ, полноэкзомное секвенирование, аллель-специфическая полимеразная цепная реакция (ПЦР), метил-специфическая ПЦР, ПЦР в реальном времени, гибридизационные методы, иммуногистохимические методы и др.) и биологических мишеней, таких как ДНК, матричная РНК, микроРНК, белки и др. использовать молекулярно-генетический анализ для поиска новых методов диагностики на всех диагностических и терапевтических этапах от постановки диагноза до выбора терапии, прогноза заболевания и мониторинга эффективности лечения (Asiago, V.M.,2010, Denkert C., 2012. Graham K., 2010, Hughes, J.H.,2008, Ooka, M., 2001, Baehner, F.L.,2010; Lu, L., 2011).

1.3 Молекулярно-генетические изменения при заболеваниях молочной железы

1.3.1 Тканеспецифические гены молочной железы

В настоящее время благодаря стремительному развитию молекулярной биологии появилось огромное количество биологически значимых показателей, которые могут помочь в дифференциальной диагностике различных вариантов рака молочной железы, прогнозе раннего рака молочной железы, а также

определить тактику дальнейшего лечения. Поэтому, перед исследователями стоит задача - помочь клиническому врачу в понимании молекулярно-биологических процессов, происходящих в опухоли, определить наиболее значимые показатели, или их комбинации, которые в последующем позволило бы подобрать оптимальную для каждого пациента схему лечения (Kalinsky K.,2014, Bleyer, A. E.,2012. Bauman, L.,2010, Dedić Plavetić, N.,2013, Caruso, F.,2006, Гришина К.А.,2016). Решению задачи ранней диагностики рака молочной железы посвящено большое количество исследований (Elston, C.W., 1991, Hu, Z. ,2006, Kontzoglou K., 2013). Однако до настоящего времени, несмотря на наличие ряда обнадеживающих публикаций, ни один из методов не вошел в стандарты обследования. Проблема своевременного выявления рака молочной железы заключается не только в его бессимптомном развитии, но и в отсутствие надёжных маркёров, способствующих раннему выявлению неопластического процесса.

Впервые, возможность обнаружить неопластические клетки в клинических образцах с использованием методов молекулярной генетики была продемонстрирована в 1991 году Sidransky D. И и соавт., которые показали возможность идентификации клеток с мутацией гена p53 в образцах мочи у пациентов, имеющих идентичную мутацию в ткани первичной опухоли. Позже было показано, что аналогичный подход может быть использован и для диагностики широкого круга опухолей, в частности РМЖ. В качестве мишеней было предложено исследовать мутации гена p53, гиперметилирование промоторов генов p16 и 14-3-3σ и др. Для диагностических целей могут использоваться различные биологические жидкости и среды (DeGraffenried, L.A., 2004, Gonzalez-Angulo, Ana M., 2011, Jobard E., 2014, Сергеева Н.С.,2011, Silva J.M.,2001).

По-прежнему, много усилий направлено на исследование специфических антигенных маркеров в периферической крови для решения целей диагностики. Относительно новым методом является исследование маркера MUC1 (маркер CA 27.29 или Truquant BR), показавшего высокую специфичность по отношению

именно к раку молочной железы, что отличает этот маркер от традиционных, используемых для диагностики и мониторинга РМЖ: СА 15-3, СА 72-4, ТПА (Сергеева Н.С., 2014, Кушлинский Н.Е., 2004, Нерр, Р., 2016, Jeschke U., 2012).

Однако последние публикации показали низкую чувствительность маркера для скрининговой диагностики, хотя его использование для мониторинга рецидивов остается актуальным. Можно также упомянуть разработку компании OTraces, США. Метод оценивает риск наличия рака молочной железы при спорной оценке результатов радиологических методов исследования и основан на определении иммуноферментным анализом в крови пациенток 5 показателей: интерлейкина 6 (IL-6), опухольассоциированного простатспецифического антигена (PSA), фактора некроза опухолей (TNF α), интерлейкина 8 (IL8), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Проведенные клинические исследования метода подтвердили его высокие диагностические характеристики. Однако дополнительная валидация метода необходима на группах пациентов с доброкачественной патологией молочной железы сейчас проходит в ряде стран, включая Россию.

Новым направлением в области разработки методов ранней диагностики является использование методов секвенирования следующего поколения (NGS) для анализа циркулирующей ДНК. Метод позволяет выявить опухолевую ДНК (имеющую специфические соматические мутации) в периферической крови уже на ранних стадиях заболевания, однако пока это метод рекомендован только для мониторинга рецидивирования. Описано обнаружение циркулирующих опухолевых клеток с помощью методов проточной цитофлуориметрии или специализированных чипов (Roy-Chowdhuri, 2015, Saunus, J.M., 2015).

Необходимо также отметить большие усилия, направленные на применение методов протеомики и метаболомики – скрининг белков сыворотки и/или низкомолекулярных метаболитов для разработки высокоспецифических, многопараметрических методов ранней диагностики РМЖ (Cuzick J., 2011, Hennessy B.T., 2009, Leone F., 2001.) Также перспективным тестом, в частности, является определение отношения экспрессии уракиназного активатора

плазминогена (uPA) и его ингибитора (PAI) в плазме крови и выделениях из соска (Кушлинский Н.Е.,2013).

Однако, необходимо еще раз подчеркнуть, что в настоящее время нет лабораторного теста, который может быть рекомендован для скрининга рака молочной железы.

Таким образом, современные молекулярно-диагностические методы анализа ориентированы на неинвазивные методы исследования биологических объектов и в первую очередь на исследование циркулирующей крови. Одним из перспективных скрининговых и диагностических тестов является определение мРНК маммаглобина в циркулирующей крови, маркер отличается высокой специфичностью в отношении рака молочной железы, особенно на ранних стадиях заболевания. Из-за высокой специфичности, маммоглобин привлек большое внимания исследователей и за последние годы было опубликовано более 150 научных исследований в этой области (Marques A.R.,2009, Zach O. ,2000, Zehentner V.K.,2004, Span, P.N. 2008). Обсуждается диагностическая информативность мРНК гена, кодирующего белок маммаглобин, как нового, специфического маркера рака молочной железы. В более чем 30 исследованиях показана высокую значимость маммоглобина-альфа в обнаружении метастазов у пациенток с РМЖ, в то время как другие исследователи оценили его роль как диагностического и прогностического маркера, и его потенциальное использование именно в этой роли. Ряд авторов, (Backus J., 2005, Viale G.,2008, Douglas-Jones AG.,2009), определяя мРНК маммаглобина и цитокератина 19 в сторожевых лимфатических узлах, показало, что чувствительность и специфичность в диагностике РМЖ возрастает до 90% и 94% соответственно. Учитывая то, что маммаглобин специфичен для клеток эпителия молочной железы и обычно его сверхэкспрессия определяется при раке молочной железы, многие исследователи пытались использовать маммоглобин, как маркер метастазов рака молочной железы в крови, лимфатических узлах и в костном мозге (Watson MA,1996; Watson MA,1999; Zach O,2000; Silva JM, 2001; Leone F,2001; Ooka M, 2001). Однако, данные о роли маммоглобина как

прогностического маркера рака молочной железы в плазме крови противоречивы (Span P.N., 2005, Zehentner B. K., 2004, Marques A.R., 2009).

Развитие методов хромато-масспектрометрии в последние годы привело к повышенному интересу в области изменения низкомолекулярных метаболитов при развитии злокачественных опухолей и формировании нового направления – метаболомики. Предпринимались попытки диагностики рака молочной железы по измерению концентрации в плазме крови таких метаболомных маркеров как аминокислоты (например, глицина, аргинина), органические кислоты (пентадекановая кислота) и нуклеотиды (цитидин-5'-монофосфат, 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин, 5-гидроксиметил-2'-деоксиуридин) (Zhang A., 2013), холин-содержащие метаболиты (холин, фосфохолин и глицерофосфохолин) (Denkert C., 2012), а также использовать метаболомные маркеры для оценки рецидивов рака молочной железы (Asiago V.M., 2010) и наличия микрометастазов (Oakman C., 2011; Tenori L., 2012). Также, есть данные, что панель специфических низкомолекулярных маркеров, выявленных в сыворотке крови, позволяет достоверно дискриминировать больных с локализованным и метастатическим раком молочной железы. Эта панель включает: гистидин, глутамат, фенилаланин, ацетоацетат, глицерол, пируват, N-ацетилгликопротеин и манноза (Jobard E., 2013). Но, несмотря на масштабные исследования метаболомных маркеров, они не обладают высокой специфичностью, т.к. могут обнаруживаются как в нормальных, так и в трансформированных клетках, требуется валидация диагностической ценности этих маркеров с использованием контрольных исследований здоровых доноров, больных с доброкачественными и злокачественными новообразованиями молочной железы (Тамкович С.Н., 2014).

Наиболее сложным для дифференциальной диагностики злокачественного процесса в молочной железе, а именно рака молочной железы представляются заболевания, сопровождающиеся гиперпролиферативными процессами, поскольку типичные критерии для злокачественных заболеваний для них также характерны (Weissenbacher, T.M., 2010). Спектр подобных состояний достаточно широко представлен в классификации ВОЗ (гистологическая классификация ВОЗ

2003 год). В 2011 году в Лионе состоялось заседание рабочей группы по опухолям молочной железы Международного агентства по изучению рака (International Agency for Research on Cancer – IARC) которая пересмотрела существующую классификацию (Singletary, S.E., 2002; Lovrics, P.J., 2011). Большое количество изменений внесено в классификацию эпителиальных опухолей. Выделен большой раздел предопухолевых поражений молочной железы. И, конечно же, в новом издании гистологической классификации большое внимание уделено иммуногистохимическим и генетическим методам исследования при раке молочной железы. Особое внимание уделяется таким маркерам как рецепторы эстрогена и прогестерона. Так как оценка этих показателей важна для выбора гормональной терапии. Обращает внимание, что исследование уровня Ki-67 для назначения химиотерапии в этой классификации не отражена (Г.А. Франк и др., 2013). И все-таки, проблема своевременного выявления рака молочной железы заключается в отсутствие надёжных маркёров, способствующих раннему выявлению неопластического процесса.

Так какими же свойствами должны обладать опухолевые маркеры? По мнению исследователей в этой области опухолевые маркеры должны коррелировать с размерами опухоли, они должны обнаруживаться до клинического проявления опухоли и ее рецидивов (Белохвостов А.С., Кулигина, Е.Ш., 2010, Сергеева Н.С., 2014). Поэтому интеграция определение характера молекулярно-генетических изменений в ткани молочной железы, с морфологическим исследованием, позволит с достаточной точностью проводить дифференциальную диагностику гиперпролиферативных заболеваний (Li, R, 2015). Очевидно, что в основе морфологических проявлений фенотипа опухоли лежат изменения генетического материала составляющих ее клеток. Изменение активности транскрипции генов, контролирующих апоптоз, пролиферативную активность, свойства подвижности и адгезии клеток на макроскопическом уровне проявляется скоростью роста опухолевого узла, метастатическим потенциалом опухоли. Непосредственным же критерием оценки активности транскрипции того

или иного гена является количественное определение молекул информационной РНК в клетках ткани молочной железы.

В настоящее время количество работ, посвященных выявлению потенциальных маркеров, ответственных за нарушение вышеперечисленных функций, большое множество (Li R.,2015, Lee H.J., 2015. Giuliano A.E., 2011., de Ronde, J.J.,2010, Weigelt B., 2010).

Это и протоонкогены и онкогены, различные гормонзависимые белки, протеазы, рецепторы стероидных гормонов и многие другие. В данной работе целесообразно рассмотреть наиболее важные, с нашей точки зрения, молекулярно генетических маркеры.

1.3.2 Функциональная роль основных генов канцерогенеза РМЖ

Гены контроля пролиферации. Продукт гена **Ki67** является традиционным маркером уровня пролиферации в ткани, т.к. показано, что он экспрессируется исключительно в клетках, находящихся в процессе деления и не обнаруживается в интерфазных клетках, находящихся в G0 (Lellé R.J.. 1990; Scholzen T.,2000). Показано, что его экспрессия значительно увеличена как в ткани злокачественных опухолей различной локализации, включая и РМЖ (Gerdes J.,1990). В последние годы появились исследования, посвященные прогностической роли уровня экспрессии Ki67 в ткани молочной железы при ее доброкачественных изменения (склероз и т.п.)(Santisteban M.,2010; Yang XQ, 2011). Например, в исследовании клиники Мейо проведено изучение изменения экспрессии Ki67 в ткани молочной железы и показано, что его увеличение наблюдается не только при раке молочной железы, но и при склеротических процессах (Nassar A., 2015). Ki67-это очень универсальный маркер, его экспрессию можно наблюдать при различных злокачественных образования, и достаточно подробно изучен при раке молочной железы (Li, B.J, 2004; Kontzoglou K., 2013, van de Vijver M.J. ,2002, Stuart-Harris, R., 2008; Zubor P., 2015).

STK15 отвечает за синтез центросомальной серин/треонин киназы (Aurora A) фермента, участвующего в разделении хромосом во время митоза.

Сверхэкспрессия данного гена приводит к centrosомным аномалиям и хромосомной нестабильности проявляющейся отменой ДНК-обусловленного сигнала к апоптозу (Vader, G., 2008). Это приводит к неконтролируемому делению клеток опухоли, появлению мутаций и изменению генотипа. В настоящее время широко изучаются участие киназ (Aurora) в процессах клеточного деления. Так работа Fu J в 2008 г. показала, что деятельность киназ (Aurora) регулируется главным образом путем фосфорилирования и деградации. Нарушения в деятельности этого гена может привести к митотическим аномалиям и вследствие этого генетической нестабильности, приводя к дефектам функции centrosомы и т.д.

В исследованиях Yamamoto (2013) и Qin W.W. (2015) изучено влияние данного гена на прогноз при РМЖ. В обоих исследованиях отмечается снижение безрецидивной выживаемости пациенток с высокой экспрессией STK15, а также корреляцию между высоким уровнем экспрессии размерами опухоли, низкой степенью дифференцировки и отрицательным гормональным статусом.

Первое упоминание об экспрессии этого гена в работе Takuji Tanaka и соавторов 1999, где при иммуногистохимическом исследовании была выявлена повышенная экспрессия этого гена в инвазивной протоковой аденокарциноме. При этом в доброкачественных клетках молочной железы экспрессия STK15 практически не наблюдалась.

Изучение уровня экспрессии STK15 при РМЖ и хромосомальной нестабильности также показало, что уровень экспрессии STK15 значительно повышен при различных вариантах РМЖ и связано это с хромосомальными нарушениями. Поэтому, определение уровня экспрессии STK15 при РМЖ может быть полезным индикатором неблагоприятного прогноза и резистентности к проводимой терапии (Miyoshi Y., 2001, Tang, W., 2013; Zheng F.M., 2014; Goktas S., 2014, Weier H.U., 2013).

В работах показано, что уровень экспрессии Aurora B (семейство серин/треониновых киназ) может быть повышен при раке различной локализации, в том числе и при раке молочной железы (Zhang Y., 2015).

Иммуногистохимическое исследование определения уровня Aurora B, Ki67 и p53 в 312 случаях инвазивного рака молочной железы показало: уровень экспрессии Aurora B коррелирует с индексом пролиферации и экспрессией p53 в ткани рака молочной железы, экспрессия Aurora B коррелировала с наличием метастазов в лимфоузлах и гистологическим типом (Talmage, J.E., 2010). Многофакторный анализ показал, что повышенный уровень экспрессии Aurora B является предиктором плохой выживаемости. В подгруппе пациентов, получавших неoadьювантную химиотерапию, обнаружено, что повышенная экспрессия Aurora B способствовала развитию опухолевой химиорезистентности (Yiqian Zhang, Chunling Jiang 2015).

Несмотря на многочисленные работы, посвященные прогностической роли различных представителей серин/треониновых киназ (Aurora A, Aurora B) результаты исследований остаются дискуссионными. Большой ретроспективный анализ пациенток с диагнозом – рак молочной железы с 15-летним периодом наблюдения показал, что уровень экспрессии исследуемых киназ в первичной опухоли был различным, при этом повышенная экспрессия Aurora A высоко коррелировала со снижением выживаемости, со стадией заболевания, высокой экспрессией HER-2/neu и экспрессией рецепторов к прогестерону. В то время как уровень экспрессии Aurora B никаких значимых корреляций с выживаемостью не обнаружил (Nadler Y, 2008; Royce ME, 2004). В подтверждении значимости Aurora A можно привести работу Yalcin Cirak (2015) в которой при ретроспективном анализе 49 образцов молочной железы, показана значимая корреляция между высоким уровнем экспрессии экспрессии Aurora A и снижением чувствительности к таксанам, но не было обнаружено корреляционных связей между кликопатологическими параметрами, включая гистологические тип, наличие рецепторов к эстрогенам и уровнем экспрессии Aurora A, при этом опухоли экспрессирующие her2, имели значительно более высокий уровень экспрессии Aurora A по сравнению с her2 негативными опухолями. Анализ Каплана-Мейера выживаемости не выявил достоверной корреляции между уровням экспрессии Aurora A и общей выживаемостью, хотя

пациенты с низким значениями экспрессии Aurora A имели значительно большую выживаемость по сравнению с пациентами с высоким уровнем Aurora A. Исследования в очередной раз демонстрируют, что Aurora A может быть использован как прогностический маркер и являться перспективным маркером прогнозирования у пациентов с раком молочной железы (Cirak Y., 2015, Siggelkow W., 2012).

CCNB1 (cyclin B1). Продукт гена CCNB1 контролирует митоз клеток, осуществляя переход из G2 в M-фазу митоза. Сверхэкспрессия гена приводит к увеличению пула делящихся клеток. Исследования данного гена, установили взаимосвязь между высоким уровнем его экспрессии отрицательным гормональным статусом и высоким уровнем Ki-67 при РМЖ (Agarwal et al., 2009). В последних исследованиях есть данные о высокой прогностической значимости уровня экспрессии CCNB1 для рецептор позитивного РМЖ как для риска рецидивирования, так и для оценки общей выживаемости (Chae, S.W., 2011, Polat AK., 2016, Ding K., 2014).

Так же показано, что CCNB1 может являться предиктором безрецидивной выживаемости и у ЭР+ пациентов с раком молочной железы, быть полезным в оценке общей выживаемости. Наконец, показано, что CCNB1 может отвечать за контроль гормонотерапии. Однако, и в этой работе, авторы для подтверждения своих результатов рекомендуют провести большие рандомизированные исследования (Ding K., 2014, Dedić Plavetić N, 2013), эти же авторы указывают, что прогностическая и диагностическая значимость уровня экспрессии CCNB1 при РМЖ в настоящее время изучена недостаточно.

MYC. Ген MYC является одним из ключевых регуляторов многих внутриклеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, апоптоз некоторые метаболические процессы.

Нарушение регулирования работы MYC играет важную роль, как в процессах инициации малигнизации, так и в прогрессии РМЖ (Мао, Х.У., 2011). Показано, что экспрессия MYC отличается в различных фенотипах рака и он гиперэкспрессируется в базальном подтипе (Xu, J., 2010). BRCA1 является

супрессором MYC и потеря функции BRCA1 приводит к гиперэкспрессии MYC (Ren, J., 2013). MYC является обратным регулятором эстрогеновых рецепторов и семейства эпидермальных факторов роста и поэтому может вносить вклад в резистентность к адьювантной терапии. MYC достоверно коррелирует с агрессивным фенотипом опухоли и с плохим клиническим течением заболевания. Так, повышенная экспрессия MYC является важным предиктором при назначении her2-таргетной терапии, а так же в brca1-ассоциированном раке молочной железы делает его важным объектом в трижды негативном раке молочной железы (Stine Z.E., 2015; Chen Y. 2008; Jinhua Xu, 2010). В работах Green AR (2016). Показано, что высокие экспрессии MYC и c-MYC коррелировали с плохим прогнозом, размером опухоли и базально клеточным молекулярным фенотипом рака молочной железы, для лиминального тапа А экспрессия c-MYC тесно коррелировала с PIK3CA, Cyclin B1 и Ki67. Экспрессия c-MYC является независимым предиктором более короткого срока появления метастазов при люминальном А типе рака с N+ стадией получавших гормонотерапию, а также плохой выживаемостью. Таким образом, подтверждается активная роль гена MYC и связана она с конкретными молекулярными подтипами рака молочной железы. Эти исследования ещё раз демонстрируют необходимость дальнейших исследований изучения механизмов и функций MYC в различных молекулярных подтипах РМЖ.

MYBL2. Как и предыдущие гены MYBL2 (MYB proto-oncogene like 2) принимает участие в клеточном делении и регулирует экспрессию таких важных в патогенезе РМЖ генов как BCL2, BIRC5, COL1A1, COL1A2, COL5A2, ERBB2, CLU, LIN9 и TOP2A. MYBL2 фосфорелируется циклин А/зависимой киназой 2 в S-фазу клеточного цикла и в дальнейшем является активатором клеточного деления. Роль данного гена/белка при РМЖ малоизучена, однако, имеются сведения о его связи с “трижды негативным” раком (Thorner., 2009, Тао, D., 2014). Предполагается, что MYBL2 входит в группу генов играющих ключевую роль, как в процессе патогенеза, так и гетерогенности молекулярных фенотипов РМЖ (Li R., 2015).

P16. Ген/белок P16ink4A –один из ключевых ингибиторов клеточного деления. Он участвует в деление клетки за счет блокирования сигнала на уровне циклина D - активатора перехода клетки из G1 в S фазу клеточного цикла. Нарушение функционирования данного гена в виде мутаций, гиперметилирования промотора показаны в качестве механизмов канцерогенеза для многих типов злокачественных опухолей. (Bazarov et al., 2011; Pape-Zambito D, 2014). Работами многочисленных исследований подтверждается, что экспрессия определенных генов, различна при четырех основных молекулярных подтипах рака молочной железы. Так, например, в работе Milde-Langosch K в 2001 году показано, что гиперэкспрессия p16 характерна для более злокачественного фенотипа. А в работах (Shan M, 2013; Abou-Bakr A.A,2013) показано, что p16 играет ключевую роль в процессе канцерогенеза и переходе DCIS to IDC для люминального А фенотипа, и p16 в паре с p53 играют ключевую роль в образовании тройного негативного фенотипа. Высокая прогностическая роль p16 для РМЖ отмечается в работе (Peurala E., 2013) показано также, что уровень экспрессии p16 может играть ключевую роль в чувствительность к неоадьювантной химиотерапии как рецептор позитивных, так и рецептор негативных опухолей (Witkiewicz A.K.,2012).

CCND1. Ген CCND1 контролирует образование циклина D1, который в комплексе с CDK4 и CDK6 осуществляет переход клетки из G1 в S фазу митоза. Предполагается, что его участие в патогенезе злокачественных опухолей, может быть опосредовано не только через механизм гиперэкспрессии и усиления пролиферации, но через другие механизмы, контролируемые этим геном и не вовлеченные в контроль деления клетки (Alao J.P., 2007; Rudas M., 2008; Brown, N.E., 2012; Li, Z., 2014). В исследовании (Peurala E., 2013) высокий уровень экспрессии циклина D1 связан с высокой степенью дифференцировки и положительным гормональным статусом в опухолях РМЖ. Гиперэкспрессия циклина D типична для люминального молекулярного подтипа РМЖ. Поэтому проводится много исследований по поиску ингибиторов циклиновых киназ 4/6 активируемых циклином D. Один из первых таких ингибиторов Palbociclib

показал обнадеживающие результаты при лечении пациентов с эстроген-позитивных и HER2-негативным типом рака. В работах (Rudas M., 2008; Knudsen E.S., 2010) показано, что повышенный уровень экспрессии циклина D является независимым отрицательным фактором прогноза в группе больных рецептор-позитивным раком получавшим адъювантную терапию тамоксифеном. Таким образом, исследования последних лет показывают, что оценка уровня CCND1 в комплексе с другими генами позволит создать механизм индивидуального прогноза для оценки чувствительности к таргетным препаратам.

PTEN. PTEN – ген, контролирующий липидную фосфатазу с доказанной опухоль-супрессорной активностью. Он обладает также антиапоптотической активностью. Дефект функционирования PTEN приводит к гиперактивации PI3K/Akt сигнального пути. Мутации данного гена и снижение его экспрессии характерно для процессов канцерогенеза при РМЖ (Yang, J., 2010; Kechagioglou P., 2014; DeGraffenried L.A., 2004). В настоящее время считается, что снижение экспрессии PTEN в основном связано с гиперметилированием промотора гена, а мутации, снижающие активность или делеции встречаются значительно реже (Zhang H.Y., 2013). Снижение активности PTEN в ткани РМЖ приводит к активации сигнального пути PI3K/Akt. Потеря активности PTEN имеет прогностическое значение для HER-позитивных опухолей, а также может использоваться для оценки чувствительности к таргетной терапии Трастузумабом (Stern H.M., 2015, Ning Liao, 2015).

Гены контроля апоптоза. Ключевая роль в регуляции апоптоза принадлежит гену p53. Одно из первых исследований, посвященных определению экспрессии p53 в доброкачественных и злокачественных образованиях молочной железы, было проведено Koutselini H. в 1991 году. Автор указал на отсутствие ИГХ окрашивания мембран клеток антителами к p53 в доброкачественных опухолях (фиброаденома). Kalogeraki A. (2000 г) отмечает различный уровень экспрессии p53 по данным иммуногистохимического исследования в материале, полученном при анализе образцов рака молочной железы, фиброаденомы и атипичской протоковой гиперплазии. При этом указывается на значительную

вариабельность экспрессии в рамках исследуемых групп: 72,55% для РМЖ, 41,2% для фиброаденом и 34% для атипической протоковой гиперплазии. По результатам иммуногистохимического исследования Ranade K.J. (2009 г.) экспрессия p53 и сурвивина в фиброаденоме отмечена в 13 % и 53% образцов соответственно, при этом показано статистически достоверное повышение экспрессии в клетках аденокарциномы и наличие обратной корреляции между экспрессией сурвивина и ER; p53 и ER, PR. Schneider L. (2009 г.) определил изменение экспрессии мРНК p53 в ткани фиброаденомы по сравнению с контролем, что позволило автору предположить особую роль p53 в патогенезе формирования опухоли.

Гены BCL2 и BAX кодируют белки семейства BCL2, обладающие антиапоптотической активностью (Mc Donnell T.J. 1989, Mc Donnell T.J. 1992). Действие их опосредовано несколькими механизмами. Относительно механизма антиапоптотического действия Bcl-2 существует несколько предположений: его эффект может быть реализован путем прямого связывания и нейтрализации Bax (Perez D, 2000; Oltvai Z.N, 1994;) и Bak (Cuconati A et al, 2003), путем повышения оксидантной устойчивости клетки и путем блокирования выхода ионов Ca^{++} из вакуолей цитоплазматического ретикулума (Baffy G. et al, 1993; Bassik M.C., 2004). Однако наиболее вероятным сценарием является связывание Bcl-2 с проапоптотическими белками III группы семейства Bcl2 - реакция, которая блокирует секрецию цитохрома C из митохондрий. BCL2 осуществляет контроль проницаемости митохондриальной мембраны, тем самым регулируя апоптоз в клетках опухоли. В исследовании (Eom Y.H., 2016) высокий уровень экспрессии данного гена сочетается с наличием в опухоли рецепторов эстрогена и прогестерона, и трактуется исследователями как благоприятный фактор прогноза. Также описана связь высокой экспрессии BCL2 и более низкой вероятностью развития локорегионарных рецидивов при РМЖ в однородных группах сравнения (Kim M.Y., 2013).

BAX лишен трансмембранного домена для связи с наружной мембраной митохондрии (Boulikas P., 1990), но способен образовывать гетеродимеры и

блокировать проапоптотические рецепторы. Yu В. и соавторы провели исследование с целью оценки изменения экспрессии белков BCL2 и BAD в нормальной ткани молочной железы, ткани фиброаденомы, при раке молочной железы у женщин в пре- и постменопаузе. Наблюдалась обратная корреляция между экспрессией BCL-2 и степенью злокачественности опухоли, а также частотой лимфогенного метастазирования (Yu В., 2010).

Сурвивин или **BIRC5**. Принадлежит к семейству ингибиторов апоптоза действуя путем инактивации каспаз (Altieri D.C., et al, 2005; Ambrosini G., 2012). Повышенная экспрессия белка BIRC5 описана для большого количества злокачественных опухолей, но практически отсутствует в дифференцированных клетках (Sah N.K, 2006, Sommer K.W., et al, 2003). Проводилось сравнительное исследование экспрессии сплайс-вариантов мРНК сурвивина, сурвивина-2В и сурвивина-DeltaEx3 в нормальной ткани молочной железы, фиброаденоме, раке молочной железы и метастатических лимфатических узлах (Sah N.K, 2006). Для всех образцов наиболее экспрессируемым вариантом оказался сурвивин, регистрируемый в 146 из 156 (93.6%) образцов при РМЖ, в 11 из 11 (100%) метастатических лимфатических узлах, 21 из 31 (67.7%) фиброаденоме и 5 из 22 (22.7%) образцов нормальной ткани. Экспрессия мРНК всех трех форм сурвивина была достоверно выше в ткани РМЖ по сравнению с нормальной ($p < 0.0001$).

Ген TERT, ответственный за экспрессию фермента теломеразы, также относится к онкогенам. Данный фермент обнаруживается в стволовых, половых, эмбриональных и опухолевых клетках, обеспечивая им возможность неограниченного количества делений. В остальных соматических клетках экспрессия данного фермента не наблюдается. При делении соматических клеток концевые участки хромосом (теломеры) укорачиваются вследствие неспособности ДНК-полимеразы синтезировать дочернюю цепочку ДНК с самого начала, из-за отсутствия, подходящего праймера в начале цепочки. При этом происходит укорочение цепочки ДНК, в каждом клеточном цикле теряется от 3 до 6 нуклеотидных последовательностей (Cifuentes-Rojas et al, 2012; Wojtyla A et al, 2011). В 1961 г. Хейнклиф установил лимит количества делений для

соматических клеток человека равный 52 клеточным циклам. В настоящее время укорочение теломер в процессе деления рассматривают как одну из теорий старения клеток. Теломераза в процессе деления добавляет к концевому участку ДНК последовательность нуклеотидов TTAGGG, тем самым удлиняя цепочку ДНК и предотвращая потерю нуклеотидов. Таким образом, клетки с теломеразной активностью приобретают свойства иммортальности и способны к неограниченному делению, что справедливо для большинства опухолевых клеток. В исследовании (Lu L., 2011) изучена активность теломеразы в клетках рака молочной железы. Активность теломеразы выявлялась в 53 % опухолей. При этом установлены следующие закономерности: у пациентов с высоким уровнем теломеразы, определялись большие размеры первичной опухоли, чаще заболевание относилось к III и IV стадии, также данные пациенты характеризовались высоким риском отдаленного метастазирования и высокими показателями смертности. Изучение активности теломеразы в клетках опухоли является одним из перспективных направлений создания таргетной противоопухолевой терапии (Buseman C.M et al, 2012; Holysz H., et al, 2013). Американскими учеными (Shen J. et al, 2012) было проведено исследование по изучению влияния длины теломер опухолевых клеток на выживаемость при РМЖ. Результаты проведенного исследования показывают, что длина теломер не связана с общей выживаемостью, размером опухоли, степенью дифференцировки, рецепторами эстрогена и прогестерона, при этом имеется корреляция длины теломеры с экспрессией Her2/neu – чем длиннее теломера, тем выше встречаемость Her2-экспрессирующего варианта опухоли.

Гены дифференцировки и рецепторы. Роль рецепторов эстрогенов и прогестерона в развитии и прогрессии РМЖ изучена достаточно глубоко (Shoker, B.S., 1999; Yager, J.D., 2006; Oh, D.S., 2006; Pathak, T.B., 2000) Гены PGR кодирует наличие рецепторов прогестерона на клеточной мембране, тем самым участвует в дифференцировке и росте эпителия молочной железы. При этом, уменьшение количества рецепторов на клеточной мембране приводит к прекращению ответа на стимуляцию прогестероном, что нарушает процессы

дифференцировки клеток и может приводить к возникновению опухоли (Creighton, C.J., 2009; Obr A.E., 2012). Традиционно считается, что реакция рецепторов стероидных гормонов в ткани фиброаденомы соответствует реакции нормальной ткани, таким образом, можно предположить роль гормональной стимуляции в патогенезе развития опухоли. Branchini G с коллегами исследовали степень экспрессии рецепторов прогестерона А и В (PGA, PGB) и рецепторов эстрогена- α (ER α) на уровне мРНК и белка в нормальной ткани молочной железы у женщин в пременопаузе и в ткани фиброаденомы (Branchini G et al, 2009). Экспрессия белка PGA и PGB была выше в фиброаденоме, чем в нормальной ткани ($p = 0.038$ и $p = 0.031$), однако для мРНК подобной разницы отмечено не было. Тоже можно сказать и о экспрессии ER α , которая была одинаковой в обеих группах ($p=0.508$). Вероятно, прогестерон играет особую роль в биологии фиброаденомы, а нормальная экспрессия рецепторов эстрогена является характерной чертой доброкачественного образования в отличие от рака молочной железы.

HER2/neu в нормальной клетке, впервые был обнаружен в нейробластоме крыс (отсюда обозначение neu). Продуктом гена является трансмембранный гликопротеин HER2/neu, который является представителем семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR). Это семейство белков ErbB/ HER2/neu включает 4 мембрано-связанных тирозиновых протеинкиназ, представляют собой - рецептор эпидермального фактора роста. Все представители этого семейства играют большую роль в нормальном развитии и дифференцировке клеток (Yarden Y., 2001). Амплификация HER-2/neu гена и гиперэкспрессия HER-2/neu протеина наблюдаются в 10-34% случаев рака молочной железы, причем в 90–95% случаев гиперэкспрессия HER2/neu является прямым результатом амплификации гена c-erbB-2 (Massarweh S., 2006, Pauletti G, 1996). В доклинических и клинических исследованиях показано, что амплификация и/или гиперэкспрессия HER2 имеет ключевое значение в онкотрансформации и туморогенезе рака молочной железы. Гиперэкспрессия HER2/neu в опухолевой клетке коррелирует с рядом неблагоприятных факторов прогноза, а именно:

размером опухоли, высокой степенью злокачественности, уменьшением рецепторов эстрогена и прогестерона в опухоли (Yarden Y., 2001, Ross J.S., 1999). Еще в 90-х годах прошлого века в результате проведения большого количества исследований показано, что гиперэкспрессия HER2/neu является независимым прогностическим фактором для рака молочной железы с N+ и N- (Press M.J., 1997, Ross J.S., 1998). Для клинициста важно знать, что в результате гиперэкспрессии HER2/neu снижается эффективность химиотерапии и эндокринотерапии тамоксифеном и самое главное – уменьшается безрецидивная и общая выживаемость (Baselga J., 2012). Таким образом, взаимосвязь между гиперэкспрессией и/или амплификацией HER2/neu и плохим клиническим прогнозом дает основание рассматривать HER2, как важное звено патогенеза развития рака молочной железы, а также как новую и важную мишень терапии (Prat A., 2007; Slamon, D., 2011). В настоящее время продолжаются исследования в отношении значимости гиперэкспрессии HER2/neu, использования значений экспрессии в различных рекомендациях по лечению гормонзависимого рака молочной железы (Guarneri V., 2011; Perez, E.A., 2011), наличия регионарного метастазирования и т.д, включение этого показателя в различные диагностические системы (Lee H.J., 2015, Saunus J.M., 2015).

Продукт гена **GRB7** представляет собой адаптерный белок, участвующий в передаче сигнала от различных мембранных рецепторов, одним из которых является HER2/neu. Показано увеличение экспрессии этого белка при РМЖ. Гиперэкспрессия GRB7 коррелирует с плохим прогнозом для различных фенотипов РМЖ. Считается, что ингибирование его может быть эффективно для лечения РМЖ (Nadler Y., 2010). В частности, ингибирование GRB7 может быть мишенью для наиболее злокачественного варианта – тройного негативного РМЖ (Gircz O et al, 2012).

Гены межклеточных взаимодействий. Ген **CTSL2** кодирует белок, семейства пептидаз С1. Этот ген экспрессируется в ткани РМЖ, и в ткани многих других злокачественных опухолей и играет важную роль в процессе

канцерогенеза (Santamaría I., 1998). Одним из механизмов активации CTSL2 может быть результат активации E2F1/pRB пути, при РМЖ (Wong C. H., 2014).

Матриксные металлопротеазы (**ММР**) являются поверхностными молекулами клетки и способны расщеплять элементы межклеточного матрикса, также молекулы принимают участие в активации/инактивации цитокинов (Page-McCaw A, 2009; Stamenkovic I, 2000) и регулировании апоптоза (Curran S., 2004). Однако основной их функцией является участие в процессах миграции и клеточной адгезии (Chang, C.W., 2010; Barajas-Castañeda L.M., 2016). Peihong S. исследовал экспрессию nm23, MMP-2, TIMP-2 (тканевой ингибитор MMP-2) при различных пролиферативных процессах в ткани молочной железы (Peihong S., 2007). Автор установил достоверные отличия в экспрессии генов в исследуемых группах ($p < 0.05$). В случае аденокарциномы экспрессия nm23 и TIMP-2 была низкой, а MMP2, напротив, высокой. Результаты исследования подтверждаются данными Wu T.T., который определил достоверно высокий уровень экспрессии MMP2 и MMP9 в образцах рака молочной железы по сравнению с окружающей опухоль нормальной тканью и фиброаденомой (Wu T.T., 2004).

Суммируя результаты многочисленных исследований, необходимо отметить, что генетические изменения, выявленные на сегодняшний момент, не являются строго специфичными, а данные, представленные в этой области, очень разнообразны и противоречивы. Однако развитие современных методов анализа, таких как метод гибридизации ДНК на олигонуклеотидных чипах, полногеномное секвенирование, позволяющие расширить и интенсифицировать сравнительный анализ генетических изменений в норме и при патологии, вселяют большие надежды на то, что в ближайшем будущем тканеспецифичные генетические ДНК-маркёры будут выявлены и найдут широкое применение для ранней диагностики злокачественных новообразований молочной железы.

1.4 Возникновение понятия о молекулярных фенотипах опухоли. Место молекулярного фенотипа в современной классификации РМЖ

На протяжении ряда десятилетий, классическая классификация РМЖ базировалась на гистологических принципах. Были разработаны различные классификации (Weigelt В., 2009, 2010). В 2003 году Всемирная организация здравоохранения выделила 18 различных гистологических подтипов инвазивного РМЖ. Однако диагностические критерии для выделения этих подтипов были скорее субъективные и информация о гистологическом подтипе имела ограниченное применение для принятия использования в терапевтической практике (Ellis P, 2003).

Поэтому текущая стратификация РМЖ на клинически значимые подгруппы основывается на прогностических клиничко-патологических параметрах и включает такие параметры как гистологический тип, наличие метастазов в лимфоузлы, и лимфо-васкулярную инвазию. Кроме того, для таких прогностически биомаркеров как экспрессия рецепторов эстрогенов и прогестеронов, а также статус HER2 была доказана их высокая клиническая значимость (Davis, В.W., 1986; Davies С., 2011, Yin W, 2011; Hammond M.E., 2010, 2011). Исследования последних десятилетий показывают, что современные молекулярно-биологические технологии позволяют не только определять экспрессионный профиль опухоли, но и судить о развитии опухоли и даже прогнозировать характер ее поведения, т.е оценивать прогноз.

За последнее время исследования экспрессии генов с применением технологии полногеномного экспрессионного анализа на микрочипах привели к пониманию того факта, что РМЖ составляет гетерогенную группу заболеваний имеющих различные молекулярные свойства. В начале было выделено 4 подгруппы: базально-клеточный, HER2-экспрессирующий, люминальный рак и нормальноподобный (Perou С.M.,2000).

Последующие исследования и работы, посвященные детализации вариантов рака молочной железы показали, что люминальный тип рака может быть подразделен на два подтипа: люминальный тип А и люминальный тип В.

Многочисленными работами было показано, что это разделение имеет прогностическую значимость (Hu Z., 2006; Sorlie T., 2001; Sorlie T., 2003). Было также показано, что получаемые результаты не зависят от используемых методов исследования - различных способов оценки уровня экспрессии (Sorlie T., 2003). Несмотря на то, что классификация на основании иммуногистохимических маркеров получила широкое признание и применение в клинической практике, этот метод имеет ограниченную способность. Прежде всего, это связано с техническими недостатками метода, в результате чего возможно появление «ложноположительных» и «ложноотрицательных» результатов по оценке уровня эстрогеновых рецепторов (Rakha E.A., 2007). Так по данным авторов Cianfrocca M. (2009) в опухолях с положительной экспрессией ЭР, только 73% классифицируются в люминальный тип А и люминальный тип В.

В истории современной классификации РМЖ наблюдаются многочисленные проблемы исследователей связанных с появлением все новых и новых молекулярных-генетических маркеров, которые дополняют уже имеющиеся данные. В результате чего имеет место большая вариабельность в использовании пороговых значений, например, для определения позитивности по уровню экспрессии рецепторов эстрогена и прогестерона и в определении подтипа РМЖ (как, пример, включение (или нет) статус рецепторов прогестерона в определение гормон-позитивного рака молочной железы) (Трошенков Е.А., 2015; Dabbs D.J., 2011; Baehner F.L., 2010; Hammond M.E., 2010; Vaz-Luis I., 2013). Выделенные подтипы РМЖ характеризуются различными эпидемиологическими факторами риска, генетическим происхождением и отличаются ответом на системную и местную терапию.

Так, Sorlie Tet в 2001 г. была описана классификация РМЖ, где все опухоли были разделены на две большие группы.

Первая включала 3 подгруппы, опухоли каждой из них характеризовались низкой экспрессией (или отсутствием экспрессии) РЭ и некоторых дополнительных транскрипционных факторов, экспрессируемых РЭ+ опухолями:

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

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

- 1c. 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.

Вторая группа опухолей описывается как опухоли PЭ+, подобные люминальному эпителию. Группа также делится на 3 подгруппы:

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

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

- 2c. 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 подтипе ERBB2+.

Однако, эта классификация не всеми была принята однозначно (Prat A., 2010). Некоторые авторы предлагали обязательно включить группу РМЖ с низкой экспрессией клаудина (claudin^{low}) (Guedj M., 2012; Е.Ш. Кулигина, 2010). Так, дальнейшие исследования позволили выявить дополнительные новые подтипы – обогащенные интерфероном, клаудин-низкие и апокриновый рак молочной железы (Herschkowitz J.I., 2007, Parker J.S., 2009; Prat A., 2010; Farmer P., 2005). Однако, все эти попытки «вычленить» новые подтипы рака молочной железы приводят к усложнению и невозможности четко-дифференцировать по этим критериям типы РМЖ (Vogelstein B., 2013). Попытки классифицировать

опухоли рака молочной железы проводили и проводят по ретроспективным образцам, основываясь на иерархическом кластерном анализе (Perou C.M., 2000, Sorlie T., 2001, 2010), но этот метод не всегда можно использовать, так он должен включать большую ретроспективную группу.

Важным успехом во внедрении результатов молекулярной стратификации стала разработка методов классификации для конкретных данных пациента/образца ткани (single sample predictors (SSPs), т.к. используемые до этого времени методы иерархической классификации этого не позволяли. (van 't Veer, L.J., 2002; Sorlie T., 2003; Cronin, M. , 2004). Этот метод основан на анализе экспрессионного профиля конкретной опухоли в сравнении со средним экспрессионным профилем общепринятых подтипов РМЖ. (van de Vijver M.J.,2002, Hu Z., 2006). Большое количество работ посвящено использованию различных панелей SSPs, результаты работ показывают, что полученные данные очевидно согласуются с соотнесением полученного результата в определенную группу РМЖ, однако, для решения этих задач применяется сложная статистическая обработка, а некоторые опухоли так и не удается отнести к определенному подтипу (Weigelt B., 2010). Классификация на основе SSPs стала широко использоваться для предсказания эффективности терапии, исхода течения заболевания а также предсказания рецидивирования. Но несмотря на это, дальнейшие исследования в этой области предлагают совершенствовать технологии.

Интерес к реализации определения оптимальных методик (выбора оптимальных экспрессионных профилей), а также упрощение технологического процесса привело к тому, что исследователи для оценки фенотипических характеристик используют ПЦР в реальном времени. Так, еще в 2003 работы Sorlie T. по 54 генам и 2007 г. Mullins M., 2007 по панели из 40 генов использовали ПЦР в реальном времени для определения уровня экспрессии генов сумели продемонстрировать, что используя кластерный анализ можно выделить известные молекулярные типы РМЖ в 88 % и 94 % соответственно.

В последнее время методы SSP были усовершенствованы и переведены с платформы микрочипов на платформу анализа экспрессии 50 генов методом количественного ПЦР (PAM50) (Parker J.S., 2009). Разработанная модель позволяет не только определять молекулярный фенотип, но и определяет риск рецидива в течение 10 лет (risk of relapse score (ROR-S)). Следует подчеркнуть, что имеется много данных, говорящих за то, что молекулярный фенотип, определяемый методом ИГХ (получившим также наименование суррогатного метода) и методами анализа экспрессии генов имеют большие расхождения. Так, например, по данным различных авторов от 31 до 59% HER2 позитивного рака по данным ИГХ и *in situ hybridisation* (ISH) классифицируются в другие типы (Sorlie T., 2003; Prat A., 2010; Weigelt B., 2010; de Ronde JJ., 2010).

Было показано, что большая часть базально-клеточного рака молочной (~80%) является тройным негативным раком, а люминальный подтип может быть разделен на два, на основании уровня экспрессии генов, характеризующих активность пролиферации (например Ki67) (Cheang M.C., 2009; Curtis C., 2012).

Еще в 2009 году подтипы РМЖ основанные на анализе экспрессии генов были включены в соглашение 2009 St Gallen International Expert Consensus и была предложена классификация на основе методов ИГХ (Goldhirsch A et al. 2011).

На сегодняшний день для стратификации риска рецидивирования и выбора схемы лечения РМЖ разработаны несколько международных протоколов, в частности протокол конференции St. Gallen (Carlson RW, A. B., 2005), National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (Collins D. H., 2009), рекомендации Американского Общества Клинических Онкологов (ASCO) (Don. D., 1999) и компьютеризированный алгоритм оценки риска рецидивирования Adjuvant! Online (Goldhirsch A. G., 2005), (Goldhirsch A., 2009), Nottingham Prognostic Index (NPI). В основе этих протоколов лежит оценка личного и семейного анамнеза больного, размера и степени злокачественности опухоли, поражения регионарных лимфоузлов, рецепторного статуса и др. Ниже представлены рекомендации протоколов относительно назначения адьювантной ПХТ больным раком молочной железы I, II стадии:

- Рекомендации St. Gallen. Конференция проводится с 1978 года, основной целью является разработка критериев лечения рака молочной железы I-II стадии. Последние рекомендации были опубликованы экспертами St. Gallen на 11 конференции в марте 2009 года (Harold J.,2007). Показания к назначению адъювантной химиотерапии были пересмотрены с учетом прогностической роли факторов риска, в частности маркеров пролиферации и данных определения профилей экспрессии генов. Относительно гормонотерапии были даны следующие рекомендации: как монотерапия Тамоксифеном (в течение 5 лет), так и Тамоксифен (в течение 5 лет) в сочетании с хирургической или медикаментозной кастрацией рекомендованы женщинам в пременопаузе при гормоноположительном фенотипе опухоли (Higgins M.J.,2009, Jalava P. K.,2006). Последние результаты исследований подтвердили эффективность ингибиторов ароматазы у женщин в постменопаузе при гормоноположительном фенотипе опухоли (Jemal A. S.,2007), (Mouridsen H.T.,2008), тогда, как для других категорий женщин их эффективность осталась сомнительной (Muss H.V.,2009). Относительно показаний к назначению адъювантной химиотерапии авторы рекомендаций пришли к выводу, что точных маркеров для индивидуализации схемы лечения не существует. Низкое представительство рецепторов эстрогена, гиперэкспрессия HER2 и высокий индекс пролиферации являются предикторами положительного ответа на химиотерапию в целом, но неспособны определить специфичность терапии (Muss H.V.,2009).

В таблице 1.5 приведены критерии St. Gallen для выбора адъювантной химио/гормонотерапии у ЭР+/HER2 – больных. Как указано в таблице 1.5, факторами повышенного риска рецидивирования и, косвенно, показаниями к присоединению адъювантной химиотерапии к гормонотерапии являются факторы, отмеченные в первой колонке таблицы, тогда, как в третьей колонке указаны факторы, позволяющие отказаться от дополнительной ХТ. Следует отметить, что в средней колонке, представлен ряд маркеров, прогностическое значение которых неизвестно; в этом случае эксперты рекомендуют опираться на данные

валидированных профилей экспрессии в дополнение к результатам патоморфологического исследования.

Таблица 1.5 — Критерии St. Gallen для выбора адъювантной химио/гормонотерапии у ЭР+/HER2 – больных.

Выбор терапии Факторы прогноза	Относительные показания для химиотерапии	Факторы, не влияющие на решение	Относительные показания для назначения гормонотерапии в монорежиме
ЭР и ПР статус	низкий		Высокий ЭР и ПР
Степень злокачественности	3	2	1
Степень пролиферации	высокая ^а	умеренная ^а	низкая ^а
Поражение л/узлов	4 и более	1-3	Нет
Лимфоваскулярная инвазия	Наличие обширной		Отсутствие
рТ	Более 5 см	2.1-5 см	Менее 2.1
Предпочтения пациента	Использовать все возможности лечения		Избежать химиотерапии
Профиль экспрессии (значение) ^б	высокое	среднее	низкое

а – оценка пролиферации включает в себя определение индекса Ki-67 (низкий < 15 %, умеренный 16-30%, высокий > 30 %) (Ne D., 2009), а так же определение митотической активности клеток опухоли.

б – рекомендации одобряют использование валидированных систем оценки профиля экспрессии генов для решения вопроса о необходимости назначения адъювантной ХТ в сомнительных случаях.

Описывая четкие показания к назначению химио/гормонотерапии в случае маргинальных значений факторов прогноза, эксперты St. Gallen признают, что рекомендации не в состоянии, как определить необходимость назначения ХТ при умеренных значениях факторов прогноза, так и индивидуализировать схему лечения. Тем не менее, рекомендации имеют репутацию наиболее достоверных в

европейских странах, а также признаны Американским Обществом Клинической Онкологии (ASCO) и NCCN ((National Comprehensive cancer network) – сообщество 21 онкологического института США). В большинстве онкологический клиник Российской Федерации в основе клинических протоколов лечения рака молочной железы лежат рекомендации St. Gallen.

Согласно результатам исследования Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group назначение химиотерапии в адьювантном режиме больным моложе 70 лет, а также гормонотерапии Тамоксифеном всем возрастным категориям больных приводит к увеличению, как безрецидивной, так и общей выживаемости (Olivotto I.A.,2008). В соответствии с этими данными последние протоколы NCCN рекомендуют назначение адьювантной терапии независимо от возраста больной. При решении вопроса о назначении ХТ должны учитываться потенциальный эффект лечения, токсичность схемы и сопутствующие заболевания у пациента (Ravdin P.M.,2006, Ravdin P.M., 2001). В рекомендациях отмечается, что эксперты NCCN не располагают достаточными данными о необходимости проведения химиотерапии больным старше 70 лет. Хотя по данным рандомизированного исследования схема AC/CMF была признана более эффективной по сравнению с Капецитабином у больных РМЖ I, II стадии моложе 65 лет (Seruga B.T.,2009). Также не исключено, что AC/CMF не приводит к повышению безрецидивной/общей выживаемости у данной категории больных, а соотношение польза/риск не всегда адекватно. В связи с вышеуказанными фактами авторы считают необходимым индивидуализировать подходы к назначению химиотерапии с учетом сопутствующей патологии пациенток.

Оценка риска рецидивирования или смерти от основного заболевания, и вероятная польза от ПХТ.

По данным NCCN основными факторами прогноза в отношении риска рецидива или смерти от основного заболевания являются возраст, размер опухоли, степень злокачественности, количество метастатических лимфоузлов и, возможно, амплификация HER2/neu. В периодических изданиях опубликованы алгоритмы оценки этих факторов (Ravdin P.M.,2006), (Southern E. M.,1999), также

разработана и клинически апробирована компьютерная модель Adjuvant! Online (www.adjuvantonline.com) для прогноза общей и безрецидивной 10-летней выживаемости, сочетающая в себе математическую оценку всех вышеперечисленных факторов прогноза, за исключением HER2-статуса.

Рекомендации для выбора тактики лекарственной терапии РМЖ основаны на результатах рандомизированных исследований и высоко детализированы, в частности, в отношении назначения адьювантной ПХТ рака молочной железы I, II стадии:

- Размер опухоли до 0.5 см, ЭР+, л/у=0 – адьювантная терапия не показана; микроинвазивный рак, размер опухоли 0.6-1.0 см, высокодифференцированная опухоль – рекомендуется рассматривать вопрос о назначении адьювантной гормонотерапии.

- При размере опухоли 0.6-1.0 см, умеренно или низкодифференцированная аденокарцинома, наличие других неблагоприятных факторов прогноза рекомендуется определение профиля экспрессии 21 гена для решения вопроса о дополнении адьювантной гормонотерапии химиотерапией.

Отдавая должное прогностической точности методик определения профилей экспрессии генов (Mammaprint и Oncotype DX), эксперты NCCN, тем не менее, указывают, что эти данные должны учитываться лишь в сомнительных случаях, а решение должно приниматься на основе анализа всех, имеющихся фактов. Все рекомендации NCCN по поводу использования профилей экспрессии генов характеризуются как основанные на данных низкого уровня доказательности.

Персонализированные рекомендации ASCO-2010 в значительной степени отражают указания St.Gallen-2009 (Harold J. Burstein A. A., 2007) и NCCN (Sparano J.A., 2008), касающиеся адьювантной терапии ранних (операбельных) форм РМЖ. Полученная в последнее время информация о профиле генной экспрессии, характеризующая ответ опухоли на терапию и прогноз заболевания, явно усилили наметившуюся тенденцию индивидуализации планирования и проведения адьювантного лечения. Выбор адекватного системного лечения особенно сложен и

важен у больных с промежуточным риском по генетической шкале рисков, когда приходится решать какие пациенты выиграют от адъювантной химиотерапии, а какие – нет.

- Adjuvant! Online - интерактивная система, разработанная для оценки безрецидивной и общей выживаемости, а также расчета потенциальной пользы адъювантной системной терапии у больных после радикального местного лечения. Adjuvant! Online – это простая компьютерная модель, в которой прогноз построен на данных регистра выживаемости, эпидемиологии и результатов лечения (Surveillance, Epidemiology and End-Results - SEER) общей популяции больных США раком молочной железы, в возрасте 36-69 лет. Оценка эффективности адъювантной гормональной или химиотерапии производится в формате определения пропорции снижения риска на основе результатов мета-анализа «Early Breast Cancer Trialists» Collaborative Group и других рандомизированных исследований.

- Nottingham Prognostic Index (NPI) – достаточно широко распространенная система оценки выживаемости больных резектабельным раком молочной железы. Индекс рассчитывается следующим образом: стадия категории N поражения регионарных лимфоузлов (1-3) + степень злокачественности опухоли (1-3) + максимальный диаметр опухоли (до 4.9 см). Полученный результат принимает значения от 2.8 (N0; степень злокачественности 1; размер опухоли 0.4 см) до 6.8 (N3; степень злокачественности 3; размер опухоли 4.9 см). Вопрос о необходимости назначения адъювантной ПХТ решается в зависимости от общей 15-летней выживаемости (ОВ) по следующей схеме (таблица 1.6).

Таблица 1.6 — Рекомендации по проведению АПХТ.

Группы зависимости баллов	в от	80 % ОВ при индексе NPI<3.4	42 % ОВ при индексе NPI <3.4-5.4	80 % ОВ при индексе NPI>5.4
Рекомендации		Необходимость ПХТ сомнительна	ПХТ возможна	ПХТ необходима

К сожалению, возможности прогнозирования индивидуального риска рецидивирования заболевания при условии неповторимого фенотипа опухоли у каждого больного достаточно ограничены. Кроме того, критерии оценки этих систем отличаются и результаты распределения больных в группы низкого и высокого риска не коррелируют друг с другом. В связи с этим ни одна из этих систем не может претендовать на роль «золотого стандарта» в оценке прогностической эффективности. Тем более актуальным является поиск, изучение и внедрение в клиническую практику новых маркеров, способных, индивидуализировать как прогноз, так и лечение РМЖ.

Принято считать, что точность некоторых новых тест-систем (таких, например, как системы определения профиля экспрессии генов) потенциально выше традиционных методов оценки.

В 2000 году С. Perou на основе полнотранскриптомного анализа экспрессионного профиля нормального эпителия молочной железы, ткани фибroadеномы и рака молочной железы продемонстрировал существование пяти различных фенотипов РМЖ: люминального/эстроген-позитивного фенотипов А и В, с-erbB2(Her2/neu)-позитивного фенотипа, базального и так называемого нормального (normal-like) фенотипа. В дальнейшем существование последнего было опровергнуто. Многочисленные исследования подтвердили существование четырех основных молекулярных подтипов РМЖ, которые легли в основу современной молекулярной классификации:

- Люминальный фенотип А характеризуется высоким уровнем экспрессии генов, связанных с молекулярным каскадом рецепторов эстрогена (ESR1, XBP1, FOXA1, GATA3, TTF3, LIV3, HER4, PIK3RI), а также высокой экспрессией люминальных цитокератинов, специфическим метилированием генов RASSF1, GSTP1, MMP7, PEG10, APC. Для опухолей с этим фенотипом характерна низкая пролиферативная активность, относительно благоприятный прогноз, высокая чувствительность к эндокринотерапии, что дает возможность использовать менее агрессивную тактику лечения.

- Люминальный фенотип В является эстроген-позитивным и отличается максимальным среди всех фенотипов уровнем тотального метилирования генома, специфическим метилированием генов RASSF1, GSTP1, CH13L2, а также повышенным уровнем экспрессии генов каскада рецепторов эстрогена, Her2/neu и промоторов клеточного цикла. Опухоли отличаются более высоким индексом пролиферативной активности по сравнению с люминальным фенотипом А и часто менее чувствительны к эндокринотерапии, для них также характерен более высокий риск прогрессирования.

- Базальный или «трижды-негативный» фенотип характеризуется высоким уровнем экспрессии таких онкогенов как NRAS, KRAS, C-KIT, кадхерин Р (CDH3), ламинин альфа/гамма (LAMA5, LAMC1), MCM3/4/7 и базальных цитокератинов (KRT5/6/17). Иммуногистохимически характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов эстрогена, прогестерона и Her2/neu, что отражено в названии «трижды-негативный», однако с позиции молекулярного фенотипирования этот термин не является синонимом базального фенотипа, т.к. последний указывает на происхождение опухоли из базального эпителия, а не на отдельные фенотипические характеристики. Опухоли отличаются высокой пролиферативной активностью, отсутствием чувствительности к гормонотерапии и таргетной терапии (герцептин), негативным прогнозом и высоким риском прогрессирования заболевания через 2-3 года после лечения, однако опухоли с данным фенотипом, более чем другие чувствительны к цитостатической терапии. В большинстве случаев у носительниц мутаций BRCA1 развивается РМЖ базального фенотипа. В этом случае недостаточность репаративных внутриклеточных механизмов делает их чувствительными к препаратам платины, ингибиторам топо-изомераз.

- Her2/neu-позитивный фенотип отличается высокой экспрессией генов каскада эпидермального фактора роста (ERBB2 (HER2), GRB7, HRAS, MEK1/MEK2, AKT1) и высокой пролиферативной активностью. Ативация Her2/neu (ERBB2) сигнального пути делает клетки чувствительными к таргетной терапии моноклональными антителами направленными на эту мишень.

Важнейшей клинической задачей является точность определения фенотипа, что в настоящее время является основой персонализации терапии. Для этих целей реализованы несколько подходов. В частности, полнотранскриптомный многопараметрический анализ экспрессионного профиля на микрочипах, положивший начало молекулярному фенотипированию РМЖ, для клинического использования, как правило, является излишне трудоемким и часто избыточным, что в значительной степени осложняет интерпретацию результатов. С другой стороны, адаптированный к клинике и считающийся стандартом патоморфологической оценки, иммуногистохимический анализ маркеров фенотипирования не всегда обеспечивает достаточную прецизионность для обоснованного выбора терапии. На сегодня для оптимизации задачи молекулярного фенотипирования опухоли и определения прогноза рака молочной железы разработано несколько алгоритмов, в основе которых лежит анализ экспрессии генов.

1.5 Примеры клинического применения прогностических индексов на основе анализа экспрессии генов

В настоящее время, основное практическое приложение анализ экспрессии генов в ткани рака молочной железы нашел в области прогнозирования рецидивирования для планирования адъювантной химиотерапии для пациентов с различными стадиями и статусом рецепторов эстрагена. Мы считаем целесообразным дать краткое описание наиболее популярным из них.

Системы определения профиля экспрессии генов на основе ОТ-ПЦР

Breast Cancer Two-Gene Expression Ratio (H/I™) – система мультиплексной ПЦР для определения относительного уровня экспрессии гена *HOXB13* (*homeobox gene-B13*) и *IL17BR* (рецептор *IL17BR*) для оценки прогноза рецидива первичного рака молочной железы у ЭР+, N=0 больных. Ген *HOXB13* локализован 17 хромосоме и его экспрессия наблюдается только в злокачественных опухолях молочной железы, тогда как экспрессия *IL17BR* в них отсутствует (Wang Z., 2007). Прогностическое значение теста было

продемонстрировано как для пациентов, получающих (Goetz MP., 2006), так и не получающих (Shou J., 2004) гормонотерапию Тамоксифеном.

Celera Metastasis Score™ также представляет собой систему мультиплексной ПЦР для определения экспрессии 14 генов при ЭР+, N=0 раке молочной железы. Оригинальная разработка ведется компанией Celera Corporation (Celera, Inc, Rockville, MD). В исследовании, проведенном на базе различных европейских институтов, компанией-разработчиком установлено, что риск рецидивирования РМЖ у женщин из группы неблагоприятного прогноза повышен в 3.5 раза по сравнению больными низкого риска по данным теста (Garber K., 2004).

The Breast BioClassifier. Система, в основе которой лежит ОТ ПЦР, разработана Ассоциацией патологов США для дифференциальной диагностики внутренних подтипов рака молочной железы (люминальный А, люминальный В, HER2+ и трипленегативный), а также оценки риска рецидивирования. В рамках системы определяется экспрессия 50 функциональных генов и 5 референтных с использованием 384-луночного формата ПЦР. Ранее была продемонстрирована возможность дифференциальной диагностики внутренних подтипов РМЖ на основе ОТ ПЦР (Esteva F.J., 2005), а также возможность использования в качестве исследуемого материала мРНК, выделенную из парафиновых блоков (Mullins M., 2007).

Разработанный тест PAM50 или Prosigna (prediction analysis of the microarrays) — это предикторный анализ результатов микрочипирования. Суть этого теста заключается в том, что в парафинизированной ткани рака молочной железы методом ПЦР с обратной транскрипцией определяется уровень экспрессии 50 генов панели PAM50, 8 референсных генов нормализации, 6 генов положительного и 8 генов отрицательного контроля, после чего, определяется молекулярный подтип РМЖ. Алгоритм оценки риска отдаленного метастазирования учитывает: а) коэффициент корреляции между генами PAM50 и экспрессионной картиной молекулярного фенотипа, б) экспрессию генов пролиферации, в) размер опухоли. Риск развития отдаленных метастазов в

течение 10 лет (низкий, умеренный или высокий) оценивается по шкале от 0 до 100 баллов у женщин в постменопаузе, больных РМЖ I-II стадии в случае эстроген-позитивного фенотипа опухоли с учетом характера лимфогенного распространения. Панель не оценивает потенциальную эффективность адьювантной химиотерапии и на настоящий момент не включена в клинические рекомендации. Оценка клинического значения этой методики — задача будущего.

Oncotype DX™. Данная тест-система была разработана и выпущена на рынок Genomic Health, Inc. Основной задачей является определение профиля экспрессии 21 гена методом RT-ПЦР в ткани опухоли у больных раком молочной железы с целью определения риска отдаленного рецидивирования. Исследование проводят с целью определения вероятности рецидива заболевания у больных всех возрастных категорий, с впервые диагностированным РМЖ I, II стадии, ER+, NO, получающих гормонотерапию Тамоксифеном. Большим достоинством метода является возможность использовать как свежезамороженные, так и парафиновые блоки в качестве источника РНК.

Основой для создания профиля экспрессии послужили 3 исследования с участием 447 пациентов и выборкой 250 генов (Tang, G. S., 2001; Paik S., 2004, Winer, E.P., 2005). Окончательный отбор 16 генов был произведен на основании статистической силы каждого во всех трех исследованиях. Коэффициент рецидива, обозначенный в пределах 0 – 100, был разбит на 3 интервала в границах 0 – 18 (низкий риск), 19 – 30 (умеренный риск), больше 31 (высокий риск). Данные границы были выбраны на основании результатов исследования NSABP trial B-20 (Fisher B., 2001). В таблице 1.7 представлены основные характеристики платформы Oncotype DX™. Платформа Oncotype DX™ представляет на сегодняшний день наибольший как теоретический, так и практический интерес. При детальном анализе профиля экспрессии обращает на себя внимание та логика, которой следовали авторы проекта: экспрессируемость соответствующих генов отражает степень активности определенных молекулярных каскадов, играющих важную роль в развитии и прогрессировании патологического

процесса: пролиферации, активности рецепторов эпидермального фактора роста, активности рецепторов стероидных гормонов, инвазии, и т.д.

Таблица 1.7 — Основные характеристики Oncotype DX™

Основная информация о чипе	Определяемые гены
Чип: Oncotype DX™, Genomic Health	21 ген (16 функциональных, 5 референтных)
Образец опухоли: свежзамороженные или парафиновые блоки	1. Пролиферация: Ki67, STK15, Survivin, CCNB1, MYBL2
Техника производства чипа: RT-ПЦР в реальном времени	2. Эпидермальный фактор роста: GRB7, HER2
Показания для исследования:	3. Рецепторы эстрогена: ER, PGR, BCL2, SCUBE2.
<ul style="list-style-type: none"> • Стадия I, ER+, планируемая терапия Тамоксифеном • Стадия II, ER+, N0, планируемая терапия Тамоксифеном 	4. Инвазия: MMP11, CTSL2
	5. Отдельные гены: GSTM1, CD68, BAG1
	6. Гены нормализации (референтные): ACTB, GAPDH, RPLPO, GUS, TFRC

MammaPrint®. Впервые сообщение о создании профиля экспрессии 70 прогностических генов было опубликовано Laura J. van 't Veer в журнале Nature в 2002 году (Laura J. van 't Veer, 2002). MammaPrint® разработан и внедрен в коммерческое производство Agendia и выполняется только на базе лаборатории. Тест основан на определении профиля экспрессии 70 генов, описанного van't Veer в 2002 году и используется для определения прогноза рецидива РМЖ у больных ≤ 61 года с первично выявленным инвазивным РМЖ ER+, ER-, N0. В таблице 8 представлены основные характеристики платформы MammaPrint®. Предполагается, что в данном профиле отражены все основные характеристики опухолевого процесса, такие как ингибирование апоптоза, отсутствие необходимости факторов роста, нечувствительности к сигналам ингибиторов роста, бесконечный репликативный потенциал, индукция ангиогенеза, инвазия и метастазирование.

Таблица 1.8 — Основные характеристики MammaPrint®.

Основная информация о чипе	Определяемые гены
Микрочип: MammaPrint®, Agendia	Гены нормализации: ~1800
Образец опухоли: свежесрезанные замороженные срезы	70 генетических сигнатур включают следующие категории:
Техника производства чипа: 2 цветных микрочипа (Agilent Technologies)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Гены сигнальных каскадов, факторов роста, транскрипции: = 20 2. Контроль клеточного цикла, хроматин, ядерные белки: = 14 3. Клеточная адгезия, таксис, цитоскелет: = 6 4. Метаболизм, внутриклеточный транспорт, аппарат Гольджи: = 12/11 5. Убиквитинизация = 2 6. Апоптоз = 1 7. Лекарственная резистентность = 1 8. Неизвестная функция = 14
Показания для исследования: <ul style="list-style-type: none"> • Стадия I, ER+/-, ≤ 61 • Стадия II, ER+/-, N0, ≤ 61 	
<p>Определение группы пациентов высокого и низкого риска: риск рецидива опухоли оценивается как низкий, если косинус угла пересечения коэффициента корреляции для профиля экспрессии 70 генов больше 0,4 (является точкой отсечки, выбранной в оригинальном исследовании van't Veer 2002 (19)).</p>	

Обе описанные тест системы представляют большой как академический, так и клинический интерес. Прогностическая точность Oncotype DX оценивается в пределах от 67,7% до 98,9%, в среднем составляя 88,5%. Точность MammaPrint несколько ниже и составляет 80,9%. Привлекательной особенностью Oncotype DX в отличие от MammaPrint является возможность работы с фиксированной формалином тканью, а не только со свежесрезанными блоками. Целевая категория пациентов для обеих систем примерно одинакова. Это продиктовано необходимостью детализированного прогноза рецидива именно на ранних стадиях заболевания, когда вопрос о необходимости проведения химиотерапии с одной стороны, и риска развития токсических явлений с другой, стоит особенно остро. В этом отношении обе описанные выше системы удовлетворяют предъявляемым к ним требованиям, однако их недостатком является достаточно высокая стоимость. Следует также отметить, что использование данных тест-систем для массового скрининга на территории РФ достаточно затруднительно в

связи с административными трудностями транспортировки биоматериалов через границу.

Необходимо остановиться и еще на одной практической проблеме, существующей при лечении пациентов именно с ранними стадиями РМЖ. Именно для этой группы пациентов наиболее часто применяется органосохраняющее лечение. По данным ESMO (European Society for Medical Oncology) в странах европейского союза от 60 до 80 % вновь выявленных случаев РМЖ подлежат органосохраняющему лечению (ОСЛ) (Senkus E., 2013). Например в Великобритании за период с 2005 по 2008 гг в более 50% случаях первично выявленных опухолей молочной железы (МЖ) применялось органосохраняющее лечение (Jeevan R., 2012).

Органосохраняющие операции (ОСО) имеют ряд преимуществ в сравнении с радикальными мастэктомиями. Их использование позволяет сокращать сроки госпитализации в стационаре, снизить травматичность и улучшить косметический эффект, снизить частоту постмастэктомического синдрома, а также способствует более быстрой социальной адаптации пациенток (Дружков О.Б., 2010, Holmes D.R., 2011, Li, S., 2011; Kaviani A., 2013). Одним из факторов, ограничивающих широкое использование органосохраняющих операций в клинической практике, является повышенный риск локального и регионарного рецидивирования у данной категории больных в сравнении с радикальными мастэктомиями (Atalay C., 2012, Kreike B., 2008, Sacchini, V.S., 2011; Sangen M.J., 2013). Большинство авторов дают определение локальному рецидиву - как опухоли, возникающей на соответствующей стороне поражения после хирургического вмешательства и подчеркивают идентичность гистологического строения ткани рецидива и первичной опухоли (Косых Э.А., 2013, Кривохотько П.В., 2011, Лалак И.А., 2015, Харченко В.П., 2009)

Известно, что более 50% локорегионарных рецидивов, как правило развиваются в первые 3 года после проведенного лечения, при этом в период после 5 лет и более частота появления локорегионарных рецидивов не составляет менее 30% (Voogd, A.C., 2005; Yu K-D., 2011). Среди факторов, влияющих на

риск развития локальных и локорегионарных рецидивов, особое место занимает качество выполняемых радикальных резекций, заключающееся в достаточном отступе от краев опухоли (Buchholz Т.А., 2014, Houssami N., 2014).

Также согласно многочисленным отечественным и зарубежным исследованиям (Колядина И.В., 2012, Колесников Р.В., 2013, Cao J.Q., 2013, Li S., 2011, Onitilo А.А., 2015, Sangen M.J., 2013) можно выделить следующие основные неблагоприятные факторы, способствующие развитию ЛРР:

- размер опухоли более 2 см (в некоторых исследованиях более 3 см.)
- Наряду с опухоль-положительными краями резекции, считается одним из главных факторов развития локорегионарных рецидивов;
- молодой возраст (моложе 35 лет);
 - мультицентрический рост опухоли, наличие микрокальцинатов при маммологическом исследовании;
 - расположение опухоли в центральном секторе молочной железы (МЖ);
 - выявленные и гистологически подтвержденные метастазы в регионарные лимфоузлы;
 - наличие лимфоваскулярной инвазии;
 - гистологический класс опухоли (риск ЛРР увеличивается при G2-3).

Эти положения были также подтверждены на международной Сент-Галленской конференции в 2015г (Coates A. S., 2015).

После выполнения радикальных резекций, обязательным условием является проведение лучевой терапии, с целью снижения риска развития локорегионарных рецидивов. Однако, по данным большинства авторов, у этой категории больных сохраняется высокая частота локорегионарных рецидивов (Van Dongen J. A., 2000; Yerushalmi, R., 2012). В отечественной и зарубежной литературе нет четких отдельных данных по частоте развития локальных (в области резецированной молочной железы) и регионарных (в области удаленных лимфатических узлов) рецидивов. К клиничко-морфологическим факторам, влияющим на развитие

локорегинарных рецидивов, относят молодой возраст, размеры опухоли, гистологический тип опухоли и степень ее дифференцировки, состояние краев резекции. Однако различные авторы при оценке прогностической ценности каждого из этих факторов по разному оценивают их значимость .

Исследования по изучению генотипа РМЖ ведутся во многих отечественных онкологических клиниках (МНИОИ им. П.А. Герцена, РОНЦ им. Н.Н. Блохина, НИИ им. Н.Н. Петрова, НИИ онкологии ТНЦ СО РАМН и др.) (Имянитов Е.Н., 2012, Колядина И.В., 2015, Литвяков Н. В., 2014). Определение неблагоприятных маркеров открывает новые возможности для проведения скрининга, внедрения новых методик лечения, в том числе разработку современных таргетных препаратов. В 2011 г. N. D. Arvold с соавторами опубликовали результаты исследования по изучению частоты развития локорегинарных рецидивов после выполнения органосохраняющих операций среди различных биологических подтипов РМЖ (люминальный А, люминальный В, базальноподобный и Her2/neu положительный) (Arvold N.D., 2011). В работе описывается результат изучения данные 1434 пациентки, перенесших органосохраняющее лечение. Все пациентки проходили послеоперационную лучевую терапию, 91% получали системную полихимиотерапию без использования таргетных препаратов. Медиана наблюдения составила 85 месяцев. При пятилетнем наблюдении общий риск локорегинарных рецидивов составил 2,1% случаев. По результатам исследования риск рецидива возрастал в ряду - люминальный А, люминальный В – 2,3%, Her2 позитивный – 1,1%, трижды негативный и составил соответственно: 0,8%, 2,3%, 1,1% и 10,8%. Таким образом, эта и другие исследования в этой области показывают, что молекулярно-генетические особенности ткани опухоли существенным образом влияют на частоту локального рецидивирования.

В настоящее время одним из наиболее изучаемых направлений в области биомедицинских исследований РМЖ является изучение молекулярно-генетических особенностей ткани опухоли для оптимизации задач диагностики, лечения и прогноза. Большое количество исследований посвящено выявлению

маркеров отдаленного метастазирования. В тоже время, проблеме локорегионарного рецидива уделяется недостаточное внимание. Известно, что от 20 до 40% случаев развития ЛРР предшествуют отдаленному метастазированию. Этот факт указывает на независимость процессов локального и отдаленного метастазирования и придает дополнительную клиническую значимость разработке методов раннего выявления и профилактики развития локорегионарных рецидивов. Клинические и иммуногистохимические критерии прогноза ЛРР, используемые в настоящее время, не достаточно эффективны. Можно предположить, что использование современных молекулярно-генетических технологий используемых для разработки моделей прогноза отдаленных рецидивов, можно использовать и для оценки разработки моделей оценки риска возникновения ЛРР. Выявление групп пациентов высокого риска локорегионарного рецидивирования основанное на этих принципах откроет новые возможности для оптимизации хирургического лечения.

1.6 Перспективы развития молекулярно-генетических технологий в диагностике и прогнозе рака молочной железы

Если рассматривать практическое использование молекулярно-генетической информации в онкологии и, в частности, для патологии РМЖ, то очевидно первой такой информацией было доказательство более злокачественного течения опухолей, имеющих ануплоидный набор хромосом, определяемого методами проточной цитофлуориметрии или цитогенетическими методами (Bonsing В.А., 1993). Однако, хотя определение плоидности и входило в диагностический стандарт в таких странах как США, конкретных рекомендаций, по клиническому использованию этого показателя не было. Понятие генетической нестабильности опухоли появилось более 20 лет назад (Shankey S.E., 1997). Уже тогда авторы прогнозировали, что именно характеристика генетических и фенотипических изменений в конкретной опухоли позволит индивидуализировать методы прогноза и назначения программ лечения. Следует отметить, что повышенный практический интерес был также связан с появлением

таргетных противоопухолевых препаратов, имеющих специфическую чувствительность к генетически измененным клеткам (Chae, Y.K. 2011, Семиглазова, Т.Ю., 2012). Все это привело к внедрению в клиническую практику молекулярно-генетических методов, направленных на выявление и характеристику терапевтической мишени. Таким образом, в общем плане можно суммировать, что в настоящее время существует набор молекулярно-генетических методов, направленных на выявление таргетных мишеней в опухоли и набор, относительно новых методов, в основном построенных на интегральной оценке «степени злокачественности фенотипа» - как методы прогноза РМЖ. Определение молекулярного фенотипа, тоже можно отнести к методам прогноза, т.к. различные молекулярные фенотипы, в первую очередь отличаются прогнозом, и поэтому, для каждого из них выработаны рекомендации по терапевтическим подходам. Интересно, что два эти направления практически не пересекаются. Например, в рамках Национального центра по исследованию рака США существует NCI Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) – интегрирующий протеомные базы, есть интернет ресурсы, интегрирующие результаты экспрессионных (экомных) исследований, большое количество баз данных по генетическим перестройкам в опухолях.

Если говорить об объеме проводим в области молекулярной онкологии исследований и основных исследовательских платформах молекулярной онкологии, то они включают весь спектр существующих методов молекулярной биологии, т.е. объект исследуется на всех уровнях, начиная с перестроек геном, через изменение экспрессии РНК и белка и завершая уровнем конечных метаболитов и включает как протеомные и метаболомные методы - хроматомасспектрометрию и протеомные чипы, так и все разнообразие методов исследования нуклеиновых кислот. Однако, в своем большинстве используемые исследовательские платформы, использовались независимо. Поэтому особенно интересно, что в 2005 году был начат проект – **The Cancer Genome Atlas Network** целью которого было интеграция существующих подходов и, фактически, уровней анализа изменений в опухолевой ткани (клетке). С этой целью

собиралась коллекция образцов «свежей» послеоперационной ткани, с регламентированными условиями подбора образцов, для удовлетворения требований различных исследовательских методов, для возможности проведения исследования в этих образцах всего спектра существующих методов. В настоящее время база включает 2000 образцов ткани РМЖ и в 2012 году появились первые публикации интегрирующие как протеомные, так и исследования экзоста и микроРНК и фосфопротеома и полноэкзомный профиль метилирования и полногеномный сиквенс (Koboldt D.C., 2012, Curtis .2012). Интересно, что эти публикации вышли в Nature – одном из наиболее цитируемых научных изданий. Последняя публикация, анализирующая результаты исследования этой базы данных также вышла в Nature в 2016 году (Mertins P. 2016). Эти публикации, как нам кажется, иллюстрируют будущее направление практического использования накапливающихся данных о молекулярно-генетических особенностях и закономерностях опухолевой ткани – интеграция различных платформ, для включения в исследование информации об изменении на всех уровнях, начиная с геномных и заканчивая метаболомными. Первые предварительные выводы, сделанные при использовании такого подхода – в наблюдаемом разнообразии молекулярных фенотипов в тканях РМЖ можно выделить большее количество устойчивых классов. Предлагается выделить 10 классов, при этом, выделение этих классов построено не только на экзомных данных, но и на всем комплексе перечисленных характеристик опухолевой ткани. И еще один важный вывод, использование различных исследовательских платформ, направленных на исследование одних и тех же метаболических путей, позволяет с более высокой достоверностью выявить ключевые молекулы (таргеты) и процессы, что перспективно с точки зрения поиска новых терапевтических подходов.

Таким образом, если констатировать существующее состояние этой области исследований, можно сказать, что текущая задача – разработка эффективных, практически применимых методов для прогноза и дифференциации РМЖ на принятые в настоящее время молекулярные фенотипы, в тоже время, анализ литературы показывает, что существующие в настоящее время принципы

классификации и прогноза, хотя и имеют реальное практическое применение, не окончательные и более углубленные и расширенные исследования позволят разработать более совершенные методы диагностики и новые подходы к терапии опухолей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование является фрагментом I темы научно-исследовательской работы, государственного задания ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России на 2015-2017 гг.: «Разработка новых технологий для ранней диагностики, мониторинга злокачественных новообразований, включая наследственные формы, оценки прогноза их клинического течения и инновационных методов лечения».

Исследование одобрено комитетом по этике ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России.

Сбор клинического материала проводился на базе клинических подразделений ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России. Обследование и лечение пациентов осуществлялось в профильных клинических подразделениях ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России согласно утвержденным клиническим протоколам РНЦРР. Морфологическое исследование выполнено в патологоанатомическом отделении ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России, под руководством заведующего отделением доктора медицинских наук Близнюкова Олега Петровича.

Молекулярно-генетическое исследование проведено в научно-исследовательском отделе молекулярной биологии и экспериментальной терапии опухолей ФГБУ «РНЦРР» Минздрава России под руководством заведующего отделом, доктора медицинских наук, профессора, заслуженного врача России Боженко Владимира Константиновича.

2.1 Объект и дизайн исследования. Критерии включения и исключения, формирование групп

2.1.1 Дизайн исследования и описание групп

Дизайн исследования был обусловлен поставленными целью и задачами.

Исследование включает несколько фрагментов, каждый из которых направлен на решение поставленных задач с целью дифференциальной диагностики и прогноза патологий молочной железы (рисунок 2.1).

Фрагмент 1 Коллекции 1 и 2 задачи № 1 и 2	Фрагмент 2 Коллекция 3 задачи № 3	Фрагмент 3 Коллекции 4 и 5 задачи № 4-7
<ul style="list-style-type: none"> • диф-диагностика заболеваний МЖ • полеоперационная - "свежая ткань" молочной железы • количество образцов - N=518 • количество пациентов N=270 	<ul style="list-style-type: none"> • диагностика РМЖ • плазма/сыворотка крови • количество образцов - N=169 • количество пациентов N=169 	<ul style="list-style-type: none"> • прогноз и фенотипирование РМЖ • фиксированная (парафинизированная ткань) • количество образцов - N=614 • количество пациентов N=325

Рисунок 2.1 — Коллекции образцов, объединенные в зависимости от задач исследования.

Первый фрагмент, был направлен на решение задач дифференциальной диагностики патологии молочной железы и включал две коллекции образцов.

1-я коллекция – образцы ткани молочной железы (n=209), полученные после операции и поступившие на молекулярно-генетическое исследование без дополнительной обработки (заморозки, фиксации, хранения и т.п.) – условно названная нами - «свежая» ткань МЖ. Образцы ткани молочной железы получены после хирургического этапа лечения пациенток с различной патологией МЖ.

Каждый образец патологической ткани этой группы имел «контроль» в виде образца нормальной ткани молочной железы, взятой на удалении от места забора патологического образца. РНК из ткани этих образцов выделялась непосредственно в день операции и полученная кДНК, хранилась при -20С до момента исследования. Исследование экспрессии генов проводилось небольшими группами, по мере накопления образцов и было завершено в течение 1 года (2009 год).

2-я коллекция – образцы ткани молочной железы после хирургического лечения, помещенные в специализированные пробирки для криохранения в жидком азоте. Эта группа включала 309 образцов ткани патологического узла и каждый образец патологической ткани этой группы имел «контроль» в виде

образца нормальной ткани молочной железы, взятой на удалении от места забора патологического образца. Эта группа образцов накапливалась и хранилась в жидком азоте в течение 5-6 лет и была проанализирована: выделена мРНК и проведено ПЦР исследование в 2016 году. Т.е. фактически был проведен анализ архивного материала. Целям исследования этой группы были: проверка надежности получаемых экспрессионных данных, в зависимости от условий получения и хранения образцов.

В сумме было проанализировано 518 образцов у 270 пациентов, распределение образцов по видам ткани приведено в Таблице 2.1

Таблица 2.1 — Распределение образцов не фиксированной послеоперационной ткани суммарно в коллекциях 1 и 2.

Тип ткани/тип патологии	ФА	РМЖ	Всего
норма	38	209	247
ФА	54	0	54
РМЖ	0	216	216
Всего	92	417	518

Второй фрагмент был посвящен решению задачи разработки метода диагностики РМЖ на основании исследования мРНК маммаглобина в периферической крови.

Для этого у 169 пациенток было проведено исследование крови методом «нестед-ПЦР» на содержание мРНК маммаглобина. Среди пациентов, у которых была исследована кровь на содержание мРНК маммаглобина, было 95 пациенток с диагнозом РМЖ, 22 – с доброкачественными заболеваниями молочной железы, 24 – с опухолями других локализаций (среди которых 8- опухоли ЖКТ, 5- рак легкого, 1- рак почки, 2- рак предстательной железы, 12-рак эндометрия) и 24 – практически здоровых добровольца.

Третий фрагмент был посвящен решению задач оптимизации методов определения молекулярного фенотипа РМЖ и разработке методов прогноза рецидивирования после различных видов лечения РМЖ. Этот фрагмент строился

на анализе фиксированной и парафинизированной ткани РМЖ, полученной после хирургического этапа лечения. Эта группа включала 325 пациентов и две подгруппы: ретроспективную, в которую вошли– 216 пациентов и проспективную – 109. Всего в этой группе было проанализировано 614 образцов ткани, т.к. для большей части пациентов имелось несколько парафинизированных образцов ткани РМЖ.

Таким образом, в ходе исследования методом количественного ПЦР было проанализировано 518 образцов не фиксированной ткани РМЖ и 614 образцов «парафинизированной» ткани РМЖ. При это в большей части образцов была исследована экспрессия 24 генов (21 функциональный и 3 контрольных), что с учетом дублей (все исследования выполнялись в повторах) составило более 50 тысяч ПЦР анализов.

2.1.2 Критерии включения и исключения, формирование групп

Критерии включения больных.

Для всех пациентов критериями включения являлось наличие подписанного информированного добровольного согласия на проведение оперативного хирургического вмешательства и включение в дальнейшее исследование.

- возраст больных от 18 до 80 лет;
- наличие гистологически или цитологически подтвержденного диагноза рака молочной железы;
- наличие гистологически или цитологически подтвержденного диагноза фибroadеномы, фиброзно-жировой инволюции, фиброзно-кистозной мастопатии молочной железы;
- функциональный статус по ECOG от 0 до 3;
- текущие лабораторные показатели крови и мочи выполненные в течение 14 дней до начала хирургического лечения.

Критерием не включения являлся отказ пациента от включения в исследование.

Все пациенты проходили обследование и получали лечение в хирургических отделениях ФГБУ «Российский Научный Центр Рентгенрадиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации в период с ноября 2000 по июль 2015 года. Стандартный минимальный объем предоперационного обследования включал проведение маммографии обеих молочных желез в двух проекциях, ультразвуковое исследование молочных желез, зон регионарного лимфогенного метастазирования (подмышечных, надключичных и подключичных лимфатических узлов) и брюшной полости, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, а также комплекс дополнительных методов исследования (КТ, МРТ, остиосцинтиграфия и т.д.) по показаниям. Рентгенологическое исследование проводили на маммографической установке "MAMMODIAGNOST US" фирмы "Philips". Ультразвуковое исследование на аппарате «SONOLINE Elegra» фирмы и «Vivid 4» фирмы GE.

Морфологическое исследование опухоли включало следующие этапы: гистологическое исследование опухоли и блока регионарных лимфоузлов (в случае рака молочной железы). При морфологическом подтверждении диагноза «рак молочной железы» проводилось иммуногистохимическое исследование экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов, прогестерона), эпидермального фактора роста HER2/neu, Ki67, а также цитогенетический анализ амплификации гена c-erbB2 методом FISH (при обнаружении высокого уровня экспрессии методом ИГХ).

Для определения амплификации гена c-erbB2 в образцах ткани рака молочной железы использовался метод флуоресцентной гибридизации in situ (FISH) с применением ДНК зондов PathVysion HER-2 (Abbott). Анализ проводился по протоколу, рекомендованному фирмой производителем ДНК зондов.

2.1.3 Клинико-морфологическая характеристика пациентов

В данном разделе представлена краткая суммарная характеристика пациентов образцы ткани которых были включены в исследование. Подробная

характеристика подгрупп каждой коллекции приведена в соответствующем разделе Главы 3 «Результаты собственных исследований».

В группу пациенток с доброкачественной патологией молочной железы, включено 54 пациентки с диагнозом фиброаденома. В таблице 2.2 приведены частоты встретившихся гистологических нозологий фиброаденом.

Таблица 2.2 — Частота гистологических нозологий включенных в исследование фиброаденом.

Виды фиброаденом	Частота	Кумул.частота	Процент
смешанная	34	34	65,3
интраканаликулярная	9	43	17,3
периканаликулярная	4	47	7,6
листовидная	4	51	7,6
гамартома	1	52	1,9

Пациенты с диагнозом РМЖ, включенные в исследование имели распределение по гистологическим диагнозам, представленное в таблице 2.3.

Таблица 2.3 — Распределение пациентов по гистологическому типу РМЖ (ИПР-инфильтративный протоковый рак, ИДР-инфильтративный дольковый рак).

Гистологический тип РМЖ	Count	Prcent.of
ИПР	393	70,43
ИДР	73	13,08
смешанный	35	6,27
слизистый	35	6,27
прочие	22	3,94
Всего	558	100,00

Таким образом, среди пациенток с диагнозом РМЖ, включенных в исследование, преобладающей группой по гистологическому типу являлся инфильтрирующий протоковый рак - 393 (70,4%) случая, инфильтрирующий дольковый рак составил 73 (13,1%) случая.

Анализ безрецидивной выживаемости пациенток ретроспективной группы включал наблюдение за данными пациентками в течение 10 лет.

На рисунке 2.2 приведено сравнение безрецидивной выживаемости в группах РМЖ с гистологическим диагнозом ИДР и ИПР.

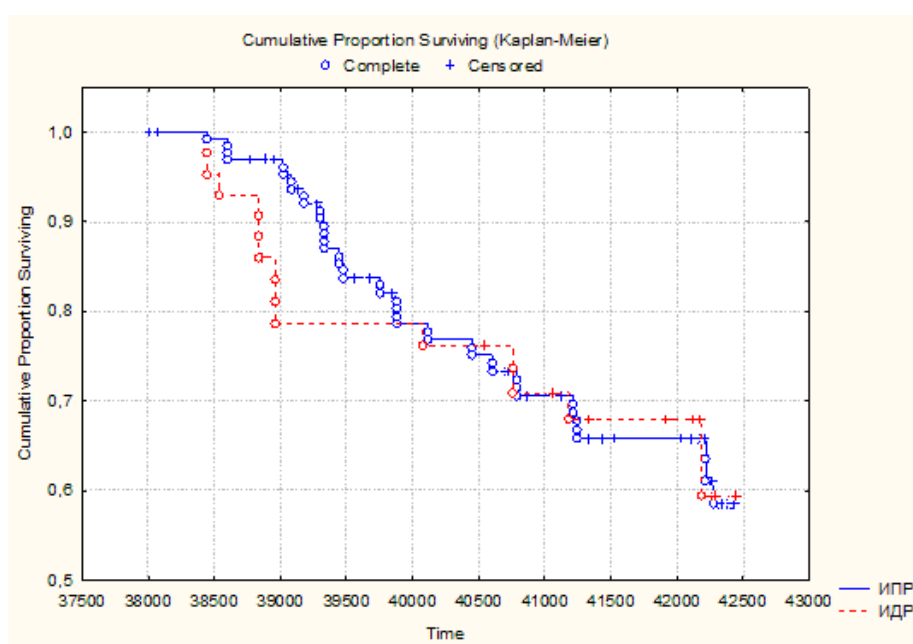


Рисунок 2.2 — Сравнение безрецидивной выживаемости в группах РМЖ с гистологическим диагнозом ИДР и ИПР.

Большую часть пациенток с диагнозом РМЖ составили пациентки стадий T1 и T2 (47,9% и 46,9% соответственно) - для определения прогноза заболевания. Пациентки с большими размерами опухоли (T3, T4) или с распространенными формами РМЖ вошли в проспективную группу, целью исследования которой была верификация точности определения молекулярного фенотипа методом ИГХ и методом РВ-ПЦР, а также группа пациенток, у которых исследовалась не фиксированная в формалине послеоперационная ткань молочной железы.

Распределение пациенток с диагнозом РМЖ по размеру опухолевого узла представлено в таблице 2.4.

Таблица 2.4 — Распределение пациентов по размеру опухоли (Т).

Т	n	%
1	285	47,9
2	279	46,9
3	8	1,3
4	23	3,8
Всего	595	100,00

Анализ безрецидивной выживаемости пациенток в зависимости от величины Т приведен на рисунке 2.3.

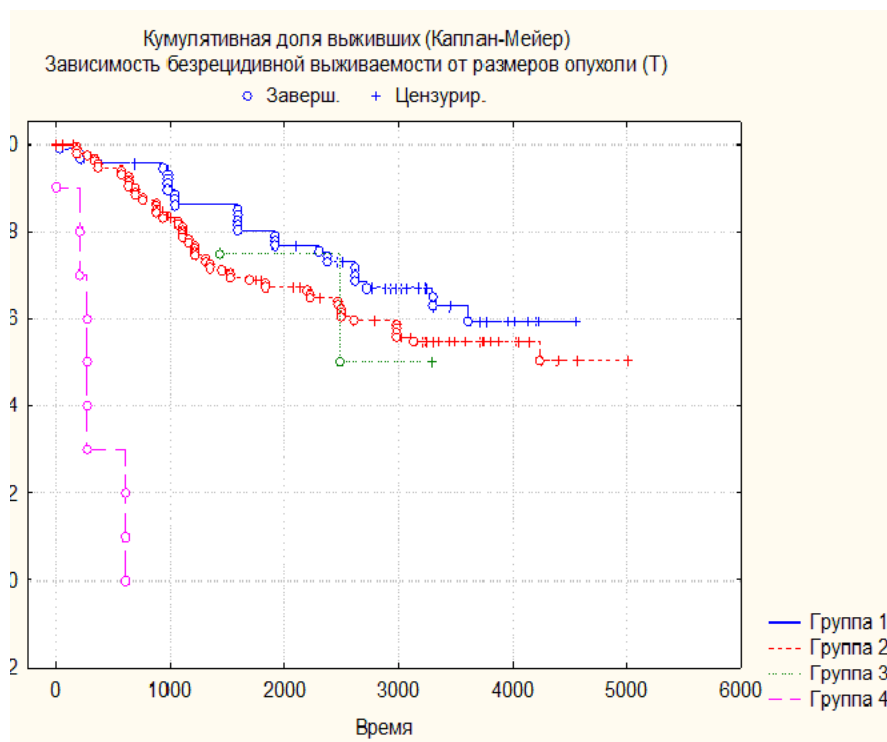


Рисунок 2.3 — Выживаемость в группе РМЖ в зависимости от величины Т по классификации TNM (номер группы совпадает с величиной Т).

Анализ показал, что чем больше размер опухолевого узла на момент постановки диагноза (Т), тем выживаемость ниже.

На рисунке 2.4 представлен детальный анализ выживаемости при начальных стадиях РМЖ T1 и T2 .

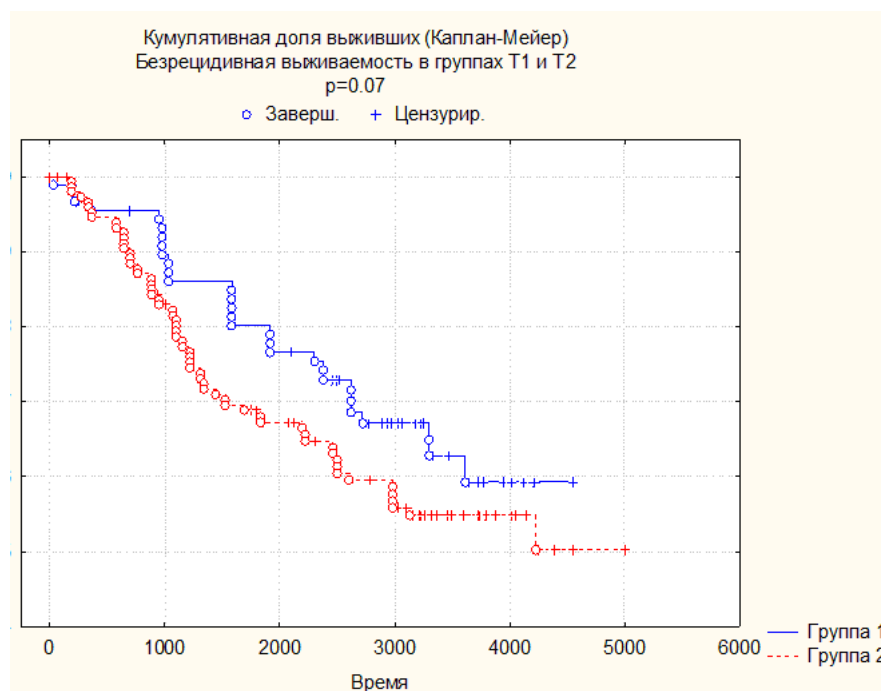


Рисунок 2.4 — Выживаемость пациенток РМЖ со стадиями T1 и T2 (отличия между группами достоверны).

Распределение пациенток, с наличием вовлеченных в опухолевый процесс регионарных лимфоузлов, представлен в таблице 2.5.

Таблица 2.5 — Распределение пациенток с диагнозом РМЖ по стадии N.

N	n	%
0	368	61,9
1	156	26,2
2	57	9,4
3	14	2,3
Всего	595	100,0

Пациентки с N0 составили 372 (61,9%) случая, сN 1 - 158(26,3%), сN 2 – 57 (9,48%), сN 3 – 14(2,33%) случая.

Анализ безрецидивной выживаемости в группах с различным значением показателя N по классификации TNM представлен на рисунке 2.5.

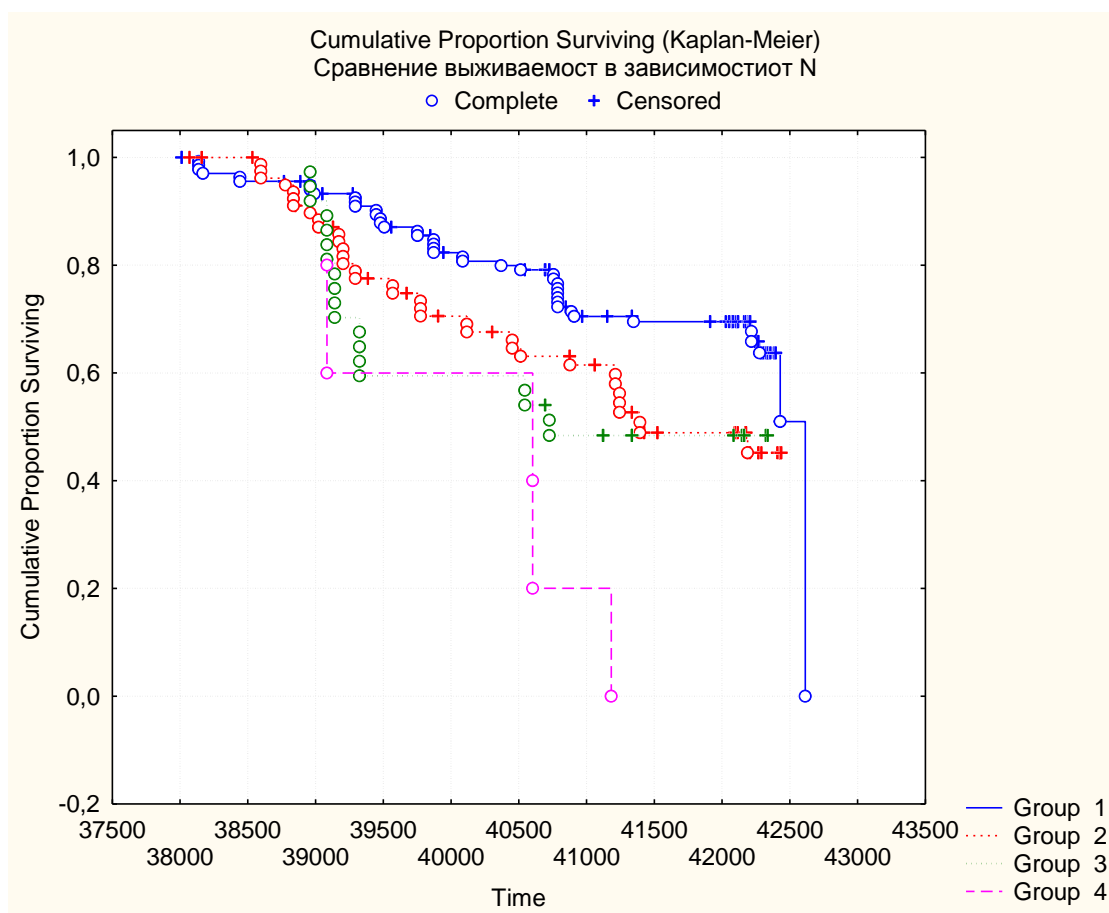


Рисунок 2.5 - Безрецидивная выживаемость в группах с различным значением показателя N по классификации TNM. Кривые выживаемости достоверно отличаются для N0-N1-N2.

В большей части образцов ткани рака молочной железы был определен статус эстрогеновых и прогестероновых рецепторов методом ИГХ. Распределение по группам представлено в таблице 2.6

Таблица 2.6 — Распределение пациентов по рецепторному статусу.

ЭР	ПР -	ПР +	Сумма
отр	61	46	107
пол	45	207	252
Totals	88	213	301

Проведенный статистический анализ зависимости сравнительной безрецидивной выживаемости в группах эстроген и прогестерон позитивных и негативных группах пациенток показал отсутствие достоверных отличий между

группами ER+ и ER-, определенных методом ИГХ (рисунок 2.6) и наличие высоко достоверных отличий выживаемости в группах PR+ и PR- (рисунок 2.7).

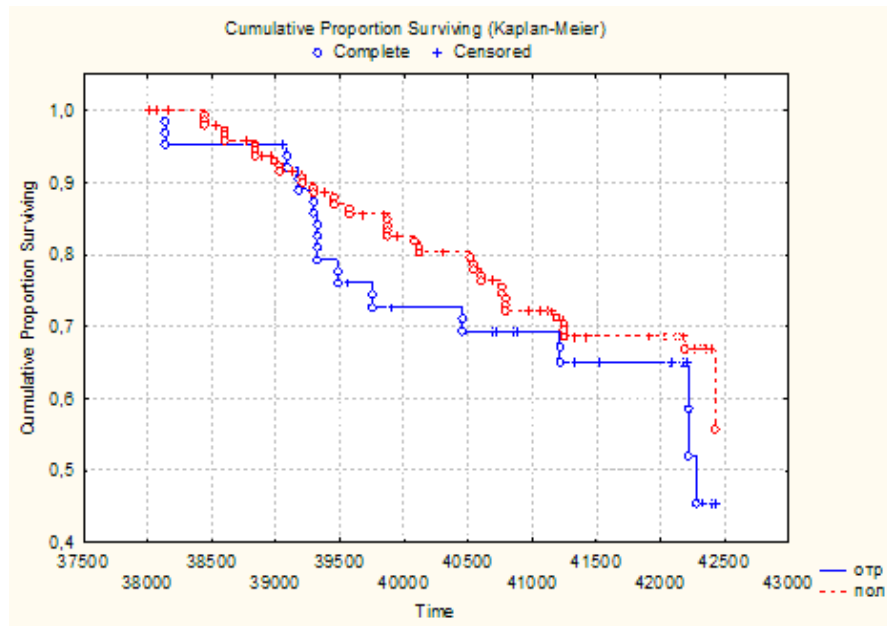


Рисунок 2.6 — Безрецидивная выживаемость в группах ER+ и ER- (ИГХ метод). Отличия недостоверны.

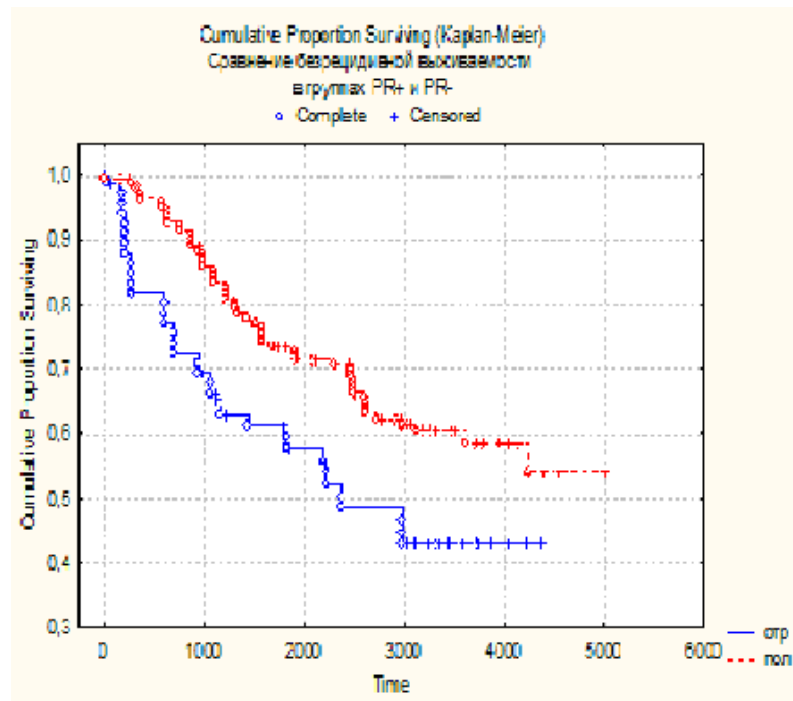


Рисунок 2.7 — Безрецидивная выживаемость в группах PR+ и PR- методом ИГХ. Отличия достоверны.

Группы пациентов с диагнозом РМЖ проходили комплексное лечение, включавшее адъювантную химиотерапию гормональную (ГТ), различные комбинации полихимиотерапии (АПХТ) и были разделены в зависимости от проведенного им лечения. Пациенты с неоадъювантной химиотерапией не включались в исследование.

Варианты соотношения гормонотерапии и химиотерапии приведены в таблице 2.7

Таблица 2.7 — Распределение пациентов в зависимости от проведенного им адъювантного лечения (ГТ и/или АПХТ).

АПХТ	ГТ +	ГТ -	Сумма
Да	145	50	195
Нет	65	6	71
Все группы	210	56	266

Приведенные в таблице 2.7 данные показывают, что большинству пациенток применялись схемы лечения включающие адъювантную полихимиотерапию и гормонотерапию (n=145), тогда как только 6 пациенток не получили никакого варианта послеоперационного лечения. 50 пациенток получили только АПХТ и 65 только гормонотерапию. Исходя из анализа базы данных историй болезней пациенток включенных в исследование, у небольшая группа не имела четкого описания наличия проведенного лечения. Так, для 26 пациенток имелись данные о проведенной АПХТ, при отсутствии данных о ГТ. Что явилось основанием включить этих пациенток в общую группу с АПХТ. Аналогично, для 17 пациенток имелись данные об отсутствии проведенной АПХТ. Группа пациенток с достоверной информацией о проведенной ГТ включает 2 пациенток с отсутствием описания о проведенной АПХТ.

При этом, независимо от гормонотерапии, количество пациенток в группах получавших АПХТ и без АПХТ приведены в таблице 2.8

Таблица 2.8 — Группа пациенток с наличием и отсутствием АПХТ.

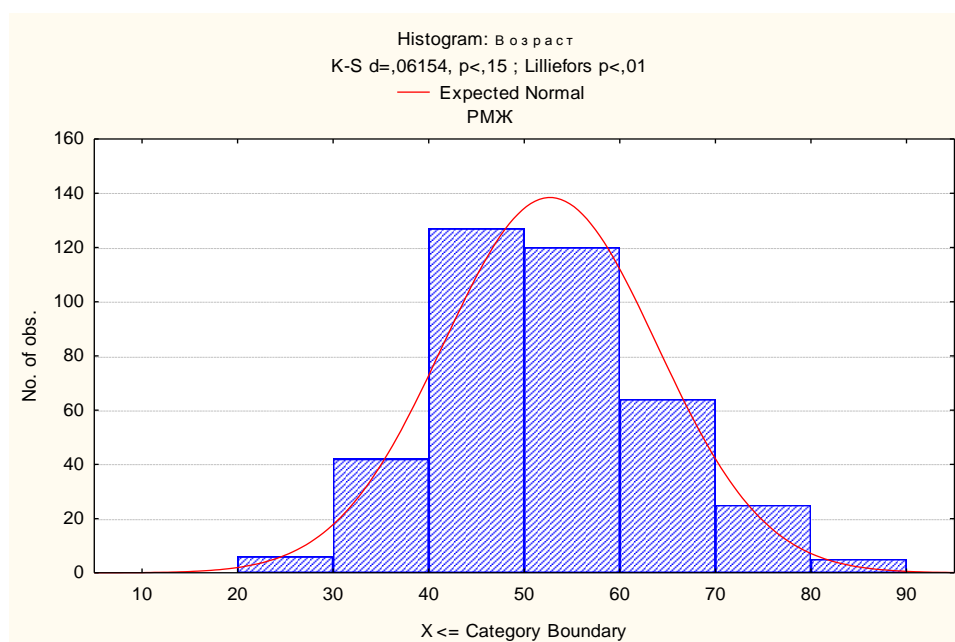
АПХТ	Кол-во	Сумма	%
да	221	221	65,3
нет	88	309	26,0

Группы пациенток, получавших гормонотерапию, независимо от АПХТ представлены в таблице 2.9.

Таблица 2.9 — Группа пациенток с наличием и отсутствием ГТ.

ГТ	Кол-во	Сумма	%
да	212	212	62,7
нет	56	268	16,5

Гистограмма распределения возраста, для всех пациенток имела нормальное распределение и приведена на рисунке 2.8. Средний возраст пациенток с РМЖ составил 53,2 лет.

**Рисунок 2.8** — Гистограмма распределения пациенток с РМЖ по возрасту.

Средний возраст пациенток с доброкачественной патологией молочной железы составил 37,5 лет и был достоверно меньше, по сравнению с группой РМЖ.

Распределения пациенток по возрасту в группах, в зависимости от проведенного лечения (АПХТ, ГТ) представлены в таблицах 2.10-2.15

Таблица 2.10 — Возраст в группе без АПХТ достоверно выше (все пациенты).

АПХТ да/нет	Средний возраст на момент операции	Кол-во пациентов	Дисперсия
да	50,0	221	10,1
нет	60,2	88	9,1
All Grps	52,9	309	11,6

Анализ распределения возраста в группе пациенток, в зависимости от наличия/отсутствия АПХТ показал, что средний возраст пациенток без проведенной АПХТ (60,2) достоверно выше, чем в группе с АПХТ (50,0).

Сравнение средних значений возраста пациенток в группах с/без проведенной ГТ показал, отсутствие достоверных отличий на момент начала лечения (таблица 2.11).

Таблица 2.11 — Средний возраст пациенток в группах с/без ГТ.

ГТ	Средний возраст на момент операции	Кол-во пациентов	Дисперсия
Да	56,7	145	11,69163
Нет	57,85	65	10,50234
All Grps	57,175	210	11,6358

Сравнение средних значений возраста пациенток в группе с проведенной ГТ показал наличие достоверных отличий между подгруппами с/без АПХТ, результаты анализа представлены в таблице 2.12.

Таблица 2.12 — Сравнение средних значений возраста для группы только с ГТ в подгруппах с и без АПХТ.

АПХТ да/нет	Возраст на опер	Кол-во пациентов	Дисперсия
Да	49,3	145	9,69052
Нет	60,65227	65	11,50022
All Grps	52,81901	210	11,52553

Анализ средних значений возраста пациенток без проведенной ГТ показал отсутствие достоверных отличий между подгруппами с/без АПХТ. Средний возраст в подгруппе ГТ-АПХТ+ - составил 51,6 лет, в подгруппе ГТ-АПХТ-62,6 лет (таблица 2.13).

Таблица 2.13 — Средний возраст пациенток с РМЖ для группы без ГТ.

АПХТ да/нет	Средний возраст	Кол-во пациентов	Дисперсия
Да	51,6	50	11,48662
Нет	62,6	6	15,12014
All Grps	52,7	56	12,25766

При сравнении подгрупп с ГТ и без ГТ в группе пациенток с проведенной АПХТ отличий в возрасте не обнаружено (таблица 2.14).

Таблица 2.14 — Средний возраст пациенток с РМЖ и проведенной АПХТ для подгрупп с/без ГТ.

ГТ	Средний возраст на момент начала лечения
да	52,8
нет	52,7

При сравнении подгрупп с ГТ и без ГТ в группе пациенток без проведенной АПХТ отличий в возрасте также не обнаружено (таблица 2.15).

Таблица 2.15 — Средний возраст пациенток с РМЖ и без проведенной АПХТ для подгрупп с/без ГТ.

ГТ	Средний возраст на момент начала лечения
да	60,6
нет	62,6

Таким образом, при сравнении возрастных групп пациенток с РМЖ в группах с различным сочетанием адьювантой химиотерапии показано отсутствие достоверных отличий.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Анализ уровня экспрессии генов методом РВ-ПЦР в операционном материале ткани молочной железы

В целом процедура от момента получения образца ткани до получения результатов ОТ-ПЦР состояла из трех этапов: выделение мРНК из образца ткани, проведение обратной транскрипции и собственно РВ-ПЦР (ПЦР в «реальном времени» или количественная ПЦР).

На этапе выделения РНК использовались коммерческие наборы RNeasy производства Qiagen USA. Обработка исследуемого материала проводилась в соответствии с протоколом компании-производителя. Объем конечного раствора составлял 60 мкл со средней концентрацией РНК в нем 35-40 мкг/мл.

После получения РНК немедленно проводился этап обратной транскрипции. Реакцию ставили, используя наборы НПФ «ДНК Технологии» согласно инструкции. Реакцию проводили при температуре 40°C в течение 30 минут, с последующей инактивацией обратной транскриптазы при 95°C в течение 5 минут. Для увеличения объемов образцов после ОТ кДНК разводили в 10 раз в

ТЕ-буфере. Полученный раствор кДНК либо немедленно использовался для ОТ-ПЦР, либо хранился при -20°C .

Для постановки ПЦР применяли реактивы фирмы «НПФ ДНК-Технология». Контроль отсутствия реакции на геномной ДНК ставили с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции, которые разводили в ТЕ-буфере в конечной концентрации эквивалентной конечной концентрации кДНК. ДНК-зонды, использовавшиеся для детекции продуктов амплификации исследуемых и нормировочных генов, были помечены FAM. Реакции амплификации генов ставили в разных пробирках в двух повторах. Амплификацию осуществляли в режиме «реального времени» в объеме 35 мкл по следующей программе: 1 цикл - 80°C 30 сек, 94°C 1 мин; 50 циклов - 94°C 10 сек, 64°C 20 сек, использовали приборы «ДТ-322» и «ДТ-964» производства фирмы ЗАО «НПФ ДНК-Технология». Измерение уровня флуоресценции проводили на каждом цикле при температуре 64°C .

Уровень экспрессии мРНК измеряли в относительных единицах, определяемых методом сравнения индикаторных циклов (C_p) согласно методу, описанному в работе Bourmenskaya O. (2012), используя следующие формулы:

$$[C_i] = 2^{C_{pi} - C_{pi \min}} \quad (\text{формула 1}),$$

где C_i – уровень экспрессии гена без учета количества материала,

C_{pi} - значение индикаторного цикла в исследуемом образце,

$C_{p \min}$ - значение индикаторного цикла в образце с максимальным уровнем экспрессии,

2 – эффективность амплификации.

$$NF_{HKG1} = 2^{C_{p \ hkg1} - C_{p \ hkg1 \ min}} \quad (\text{формула 2})$$

NF_{HKG1} - нормировочный фактор для одного нормировочного гена/HouseKeepingGene,

$C_{p \ hkg1}$ - значение индикаторного цикла в нормировочном образце1,

$C_{p \ hkg1 \ min}$ - значение индикаторного цикла в образце с максимальным уровнем экспрессии нормировочного гена 1,

2 – эффективность амплификации.

$$NF = \sqrt[n]{NF_{hg1} \times NF_{hg2} \times \dots \times NF_{hgn}} \quad (\text{формула 3})$$

NF- нормировочный фактор с учетом всех нормировочных генов, рассчитывается как среднее геометрическое,

NF_{HG1} - нормировочный фактор для одного нормировочного гена,

n – число нормировочных генов, в нашем случае n=5.

$$[C_{NF}] = [C_i] / NF \quad (\text{формула 4}),$$

где C_{NF} – уровень экспрессии гена с учетом нормировочного фактора,

где C_i – уровень экспрессии гена без учета количества материала,

NF- нормировочный фактор с учетом всех нормировочных генов.

где C_{NF} – уровень экспрессии гена с учетом нормировочного фактора,

$C_{NF \min}$ – значение в образце с минимальным уровнем экспрессии.

Фактически уровень экспрессии приравнивается к 1 в образце с минимальным уровнем экспрессии. В остальных образцах данный показатель (уровень экспрессии) отражает во сколько раз экспрессия гена выше по отношению к данному образцу.

Краткая характеристика исследуемых генов. Для каждого образца анализировалась экспрессия 24 генов (21 функциональных генов и 3 референсных). Для удобства интерпретации результатов функциональные гены были объединены в 5 групп: гены -маркеры пролиферации (KI67, STK15, CCNB1) и ингибитор пролиферации PTEN, гены ингибиторы апоптоза (BIRC5, BCL2, BAG1, TERT) и активаторы апоптоза (BAX, NDRG1), гены клеточной дифференцировки: рецептор эстрогена ESR, рецептор прогестерона PGR, рецептор эпидермального фактора роста C-erbB2 и его гомолог GRB7, а также маммаглобин MGB1, и гены межклеточных взаимодействий (MMP11, CTSL2). В качестве референсных использовали гены GUSB, HPRT и TBP. В таблице 2.16 представлена краткая характеристика исследованных генов.

Таблица 2.16 — Краткая характеристика исследуемых генов.

Кластер	Название гена	Функция
Пролиферация	<i>KI67</i>	Маркер клеточной пролиферации. Экспрессируется в фазы G1, S, G2, M и не экспрессируется в G0
	<i>STK15</i>	Кодирует серин-треонин киназу 6, участвующую в регуляции формирования веретена деления
	<i>CCNB1</i>	Кодирует белок цикли В1 семейства циклинов, контролирующих смену фаз клеточного цикла. Активация комплекса циклин В-Сdk2 необходима для перехода фаз G2/M.
	<i>PTEN</i>	Кодирует белок с фосфотазной активностью, фосфорелирующий молекулярные мишени пролиферативного каскада Akt/PKB, чем и объясняются его антипролиферативные свойства как опухолевого супрессора
	<i>CCND1</i>	Кодирует белок циклин D1 семейства циклинов, контролирующих смену фаз клеточного цикла G1-S
	<i>P16INK4a</i>	Ингибитор циклин D зависимых киназ D типа CDK4/6 и останавливает переход клетки в S фазу
	<i>MYBL2</i>	Белок - член семейства генов транскрипционных факторов MYB, — ядерный белок, участвующий в поддержании клеточного цикла. Данный белок фосфорилируется циклин A/циклин-зависимой киназой 2 во время S-фазы клеточного цикла и обладает действием как активатора, так и репрессора. Он активирует гены <i>cdc2</i> , циклина D1
Апоптоз	<i>BCL2</i>	Кодируемый белок обладает антиапоптотической активностью. Образуя комплекс с белком BAG, блокирует выделение цитохрома C из межмембранного пространства митохондрии.
	<i>BAX</i>	Белок этого гена положительно регулирует высвобождение цитохрома C и по сути является антагонистом BCL2 и BAG
	<i>BAG</i>	Коактиватор BCL2, обладающий антиапоптотическими свойствами
	<i>NDRG1</i>	Кодирует белок, необходимый для p53 опосредованной активации каспаз, чем и объясняются его выраженные проапоптотические свойства
	<i>BIRC5</i>	Кодирует белок семейства ингибиторов апоптоза, непосредственно ингибирующий каспазы – мощный ингибитор апоптоза
	<i>TERT</i>	Кодирует обратную транскриптазу теломеразы, фермент, необходимый для репликации концевых (теломерных) фрагментов хромосом. В норме активность фермента низкая, что после определенного количества делений клетки приводит к активации апоптоза

Клеточная дифференцировка	<i>ESR</i>	Ген кодирует рецептор эстрогена альфа
	<i>PGR</i>	Ген кодирует рецептор прогестерона А
	<i>C-erbB2</i>	Ген кодирует рецептор эпидермального фактора роста
	<i>GRB7</i>	Кодирует белок, моделирующий конформацию рецепторов, в частности семейства эпидермального фактора роста, при связывании с лигандами
	<i>MGB1</i>	Кодирует белок маммаглобин, функции которого неизвестны, однако согласно литературным данным, его экспрессия повышена в высокодифференцированных опухолях
Межклеточные взаимодействия	<i>MMP11</i>	Кодирует матриксную металлопротеиназу, функции которой заключаются в разрушении межклеточного матрикса. Особенно активна в эмбриогенезе
	<i>CTSL2</i>	Кодирует белок катепсин с высокой пептидазной активностью
	<i>CD68</i>	CD68 (кластер дифференцировки 68, макросиалин) — гликопротеин из семейства LAMP. Экспрессирован на поверхности моноцитов и макрофагов и используется в качестве маркера макрофагов.

Следует отметить, что с начала исследований в 2008-2009 году ПЦР наборы претерпели технологические модификации, связанные с необходимостью адаптации наборов для возможности их использования как в «свежей» ткани молочной железы, так и в архивной ткани парафиновых блоков. Это потребовало изменения пар праймеров и длины анализируемых ампликонов для большинства анализируемых генов, кроме того, была увеличена панель генов с 17 до 24 (3 хаускипинга и 21 аналитический ген). В таблице 2.17 перечислены гены, проанализированные в различных коллекциях образцов.

Таблица 2.17 — Наборы генов анализированных в различных коллекциях образцов.

Наименование гена	Коллекция 1	Коллекция 3	Коллекции 2, 4,5
KI67	x		x
STK15	x		x
CCNB1	x		x
PTEN	x		x
MYC			x
P16INK4A			x
CCND1			x
BCL2	x		x
BAX	x		
BAG1	x		x
NDRG1	x		x
BIRC5	x		x
TERT	x		x
ESR1	x		x
PGR	x		x
HER2	x		x
GRB7	x		x
MGB1	x	x	x
MMP11	x		x
CTSL2	x		x
CD68			x
MYBL2			x

2.2.2 Методы выделения и постановки реакции ОТ-ПЦР для парафинизированных тканей

Обработка методов окраски, депарафинизации и диссекции исследуемого материала. Для исследования экспрессии мРНК в парафиновых блоках была проведена разработка методики депарафинизации, окраски и диссекции исследуемого материала.

Получение материала для исследования. Материал (парафиновые блоки и срезы, полученные с них), после экспертной морфологической оценки, включавшей в себя определение типа ткани, наличия в препарате опухолевых

клеток, отсутствия обширных зон некроза, признавался пригодным для отработки методики определения экспрессии генов в парафинизированной ткани.

Депарафинизация и окраска. После удаления нескольких поверхностных слоев ткани на микротоме, для депарафинизации и окраски брался срез толщиной 10 мкм и помещался в подогретую воду и далее на предметное стекло, после чего высушивался. Депарафинизация осуществлялась путем двукратного выдерживания предметного стекла в разогретом ксилоле ($T=50^{\circ}\text{C}$) в течение 5 минут. Удаление ксилола осуществлялось путем последовательного выдерживания препарата в 96%, 70% и 50% этаноле с последующим промыванием дистиллированной водой.

Окраска гематокселин-эозином проводилась по стандартной методике (Luna L.G., 1972). Далее стеклопрепарат направлялся в патоморфологическую лабораторию для анализа.

Микродиссекция. Перед процедурой микродиссекции проводилось патоморфологическое исследование материала. Для этого депарафинизировались и окрашивались по выше приведенной методике два среза, расположенные непосредственно перед (срез 1) и после (срез 3) среза, подготовленного для микродиссекции (срез 2). Морфолог маркировал участки с максимальной концентрацией опухолевых/неизмененных клеток в зависимости от задачи микродиссекции. После определения соответствия микроскопической картины на срезах 1 и 3, срез 2 признавался пригодным для микродиссекции.

Исследуемый срез помещался на предметное стекло и под микроскопом манипуляторами микродиссектора из него удалялся фрагмент материала, по координатам, отмеченным морфологом на срезах 1 и 3. Депарафинизация этого фрагмента проводилась в соответствии с протоколом для выделения РНК. Окраска не проводилась, чтобы избежать негативного влияния красителей на материал.

Определение минимального достаточного объема ткани. Было проведено с помощью РВ-ПЦР и включало определение порогового цикла реакции при различных разведениях РНК. Выделение РНК проводили согласно

инструкции с помощью наборов реагентов для выделения РНК RNeasy FFPE Kit (Qiagen, USA). Объем образцов после выделения составил 50 мкл. Проведение обратной транскрипции и ПЦР осуществляли также, как и для РНК, выделенной из не фиксированной ткани (раздел 2.2.1 главы Материалы и методы).

Для определения оптимального количества ткани достаточного для получения воспроизводимых результатов ОТ-ПЦР были выделены кусочки ткани различной площади. Полученные нами данные (таблица 2.18), показали, что достаточным является количество ткани площадью 70 мм^2 для среза толщиной 10 мкм.

Таблица 2.18 — Изменение порогового цикла в зависимости от объема исследуемого материала.

Наборы дублей	Идентификатор пробирки	FAM	
		Cp	StD,%
B2,B3	MGB_2_мм2	38,6	2,1
B4,B5	MGB_1/10	23,0	0,7
B6,B7	MGB_1/5	21,1	0,3
C2,C3	MGB_1/2	21,9	0,1
C4,C5	MGB_1	21,6	2,0
C6,C7	MGB_2	23,1	0,3

Для эксперимента из одного образца ткани ($S=370 \text{ мм}^2$) было последовательно отобрано разное количество материала (от 2 мм^2 ткани до 2 срезов толщиной 10 мкм в одну пробирку). Выделение РНК производилось с помощью набора реагентов QiagenFFPEKit по протоколу. Ниже представлен график зависимости значения порогового цикла ПЦР (Ct) от количества исходного материала.

Согласно результатам амплификации увеличение исходного материала более $1/5$ среза (70 мм^2 ткани) не приводит к снижению порогового цикла в ПЦР, что, вероятно, связано с насыщением колонки, на которой элюируется РНК. Кроме того, результаты титрования РНК, выделенной из парафинизированной ткани, позволяют утверждать, что разведение исходного раствора до 1000 раз

приводит к повышению C_t в среднем на 12 циклов, т.е. разведение в 10-100 раз, достаточное для амплификации до 200 генов, позволяет получать воспроизводимые результаты (таблица 2.19, рисунок 2.9).

Таблица 2.19 — Статистика дублей C_t при титровании

Наборы дублей	Идентификатор пробирки	FAM	
		C_p	StD,%
B2,B3	GRB7_100%	26,4	0,2
B4,B5	GRB7_10%	29,5	0,6
B6,B7	GRB7_1%	32,9	0,6
C3,C4	GRB7_0.1%	35,8	0,1
C5,C6	GRB7_0.01%	38,9	0,8

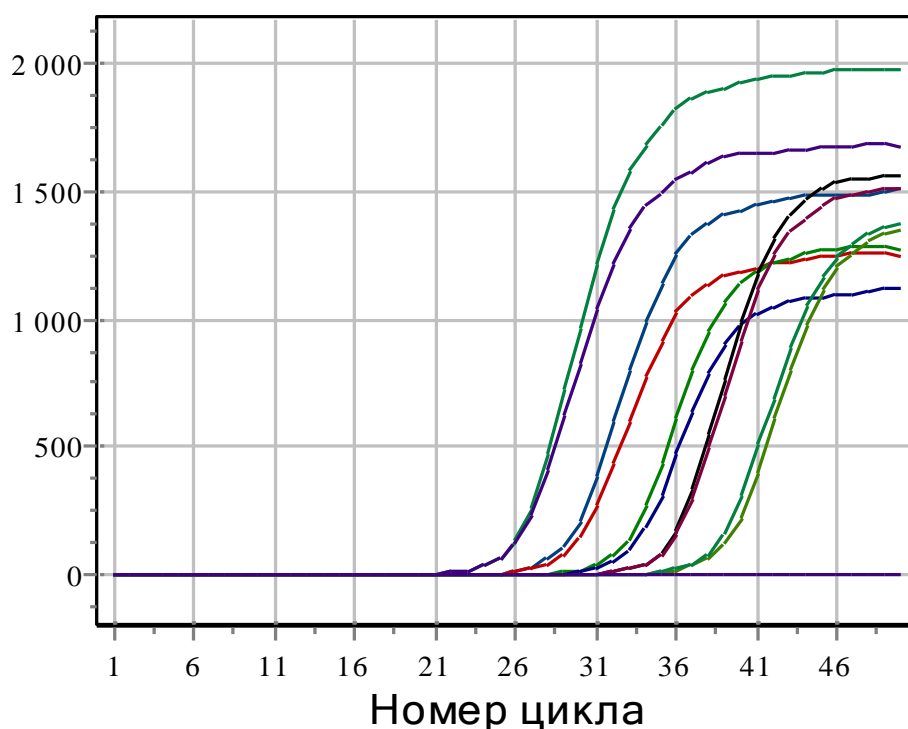


Рисунок 2.9 — Значения C_t при разведении выделенной РНК из парафиновых срезов.

Определение соотношения клеточного материала опухоли и неизменной ткани в образце исследуемого материала. Наличие опухолевых клеток в материале, а также соотношение опухолевой и неизменной ткани,

определялись морфологом. Согласно результатам определения экспрессии при наличии в срезе не менее 50% опухолевых клеток достоверных изменений в уровнях экспрессии анализируемого комплекса генов не наблюдается. При сравнении профилей экспрессии 4 функциональных генов (PGR, GRB7, MMP11, MGB) опухолевой ткани после диссекции (не менее 50% от площади поверхности среза) и целого среза значительных отличий при ПЦР отмечено не было (таблица 2.20).

Таблица 2.20 — Сравнение Ct опухолевой ткани и всего среза.

Наборы дублей	Идентификатор пробирки	FAM	
		Cp	StD,%
A2,A3	GRB7_опухоль	32,2	0,1
A4,A5	GRB8_весь срез	31,1	0,9
B2,B3	PGR_опухоль	31,2	0,6
B4,B5	PGR_весь срез	30,1	2,3
C2,C3	MMP11_опухоль	39,3	2,1
C4,C5	MMP11_весь срез	38,2	0,4
D2,D3	MGB_опухоль	29,5	0,2
D4,D5	MGB_весь срез	29,3	0,7

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение, что при наличии в материале более 50% опухолевой ткани необходимость выполнения микродиссекции отсутствует.

2.2.3 Определение критериев отбора нормальной (морфологически неизменной) ткани молочной железы, как референтного стандарта

Основная проблема, связанная с верификацией нормальной ткани молочной железы, заключается в большой распространенности диффузных патологических изменений в ткани, в особенности у женщин пожилого возраста. Часто жировая инволюция или мастопатия может носить диффузный характер, что не только затрудняет поиск неизменного эпителия при морфологическом исследовании, но и может исказить результаты экспрессионного анализа.

Согласно литературным данным тканеспецифическим маркером эпителиальных клеток молочной железы является белок маммаглобин (MMG), и экспрессия мРНК кодирующего его гена. Другой важной особенностью этого маркера является значительное повышение его экспрессии при РМЖ с высокой специфичностью. Нами предложен метод молекулярно-биологической верификации неизмененного эпителия молочной железы по соотношению экспрессии генов MMG и HPRT1. Было показано, что этот коэффициент в нормальной ткани не превышает 60 отн. ед, при этом в клетках рака молочной железы соотношение повышается до 160 отн. ед. и выше (Боженко В.К, 2016). В таблице 2.21 представлены значения коэффициента экспрессии маммаглобина, полученные для трех разных видов тканей молочной железы (РМЖ, ФА, норма).

Таблица 2.21 — Средние значение относительной экспрессии мРНК маммаглобина в различных тканях молочной железы.

Характеристики	Общее число обследованных	MGB/HPRT1, отн. ед.	Стандартная ошибка
Злокачественная опухоль	69	161,03	40,97
Фибroadенома	42	80,60	25,23
Норма	98	59,45	9,81

В связи с приведенными выше результатами можно высказать следующее предположение: для более достоверной верификации «нормальной» ткани молочной железы необходимо использовать сочетание морфологической оценки ткани молочной железы с молекулярно-биологической оценкой относительного уровня экспрессии MMG/HPRT1 что может повысить достоверность дифференцировки «норма-патология» для включения результатов определения профиля экспрессии в качестве референтного стандарта нормальной ткани молочной железы.

2.2.4 Разработка методики обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции с использованием специально разработанных праймеров, адаптированных к характеристикам мРНК, выделяемой из парафинизированной ткани

Подбор праймеров и зондов осуществляли путем анализа последовательностей ДНК и мРНК генов базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). При подборе праймеров и зондов учитывали структурную организацию генов, кодирующих мРНК, а также особенности влияния обработки парафином на РНК, описанные во введении; наличие псевдогенов; вариантов альтернативного сплайсинга. Для контроля отсутствия амплификации на геномной ДНК, ставили ПЦР с образцами, не прошедшими реакцию обратной транскрипции (ОТ).

С целью определения влияния изменения длины праймеров на результаты ПЦР была проведена сравнительная оценка C_t при использовании длинных и коротких праймеров. Для этой цели были использованы наборы праймеров (длинный+короткий) в реакции амплификации, таблица 2.22.

Таблица 2.22 — Длина праймеров, при проведении сравнительной оценки влияния изменения длины праймеров на результаты ПЦР.

Название гена	Длина праймера	
	Короткий (sh)	Длинный (lo)
PGR	81bp	237 bp
MMP	65 bp	294 bp
GRB7	75 bp	123 bp
MGB	70 bp	303 bp

На рисунке 2.10 представлены результаты проведенного исследования влияния длины праймера на значение порогового цикла РВ-ПЦР для исследованных пар.

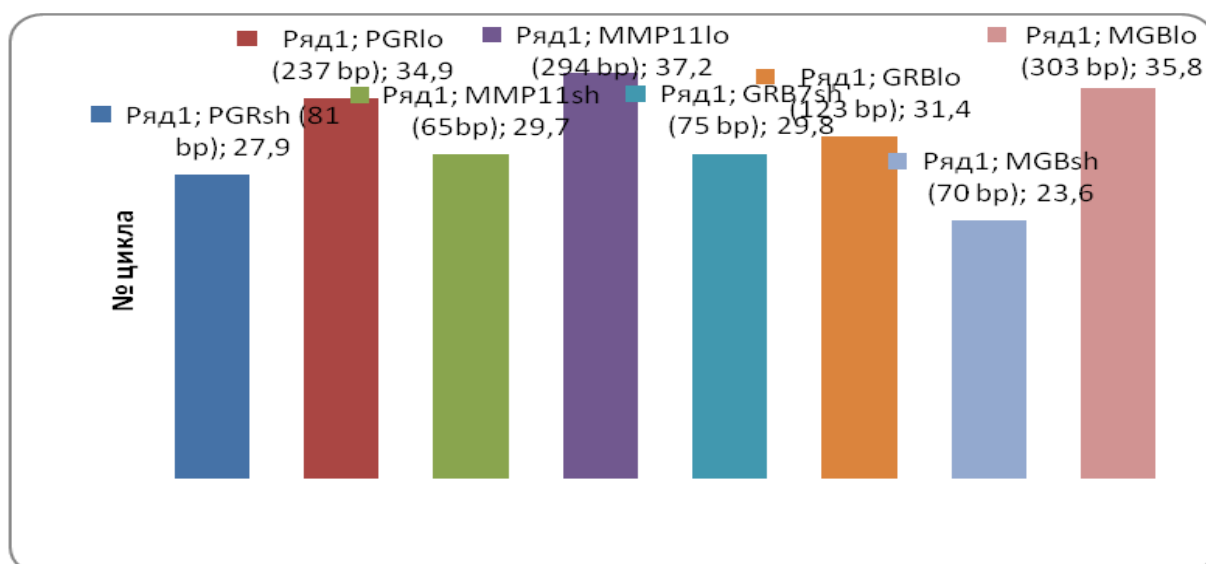


Рисунок 2.10 — Разница пороговых циклов при использовании коротких (sh) и длинных (lo) праймеров.

Мы показали эффективность праймеров разработанных специально для работы с РНК, выделенной из парафиновых блоков, по сравнению с более парами праймеров, дающих более длинный ампликон.

Кроме того, важным этапом отработки методики РВ-ПЦР является определение качества РНК в парафинизированной ткани. Известно, что после обработки формалином и парафином молекулы РНК подвергаются как структурным, так и пространственным изменениям. Для определения степени деградации РНК было предложено много методик, в частности, сравнение C_t , полученных при использовании «коротких» и «длинных» праймеров, что и было сделано в нашей работе (Cerois V., 2007).

Таким образом, нами были отработаны методы депарафинизации и диссекции парафинизированной ткани, при этом определен алгоритм действий на различных этапах процесса, описаны отличительные особенности пробоподготовки; определен минимальный объем ткани, достаточный для получения воспроизводимого результата оценки экспрессии генов, а также степень разведения исходного раствора, достаточной для исследования предполагаемого количества генов; определено соотношение клеточного материала опухоли и неизмененной ткани в образце исследуемого материала, не

влияющее на результаты экспрессии; с использованием молекулярно-генетических методов определены критерии отбора нормальной ткани молочной железы, как референтного стандарта; отработана методика обратной транскрипции и количественной полимеразной цепной реакции с использованием специально разработанных праймеров, адаптированных к характеристикам мРНК, выделяемой из парафинизированной ткани.

2.2.5 Анализ мРНК в образцах крови

Для анализа кровь пациентов собирали в пробирки, содержащие 3,2% цитрат натрия объемом не менее 3 мл. Далее пробирки помещали в холодильник на 30-60 минут, для разделения плазмы и форменных элементов крови.

Для выделения РНК брали 1,5 мл образца плазмы до границы разделения с форменными элементами крови.

Выделяли РНК при помощи набора QIAmpRNA Blood Mini Kit (Qiagen, Германия) с использованием протокола выделения «Purification of Total Cellular RNA from Human Whole Blood». В результате получали 35 мкл водного раствора РНК. Полученную РНК хранили при -70°C . Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора Quanti Test Reverse Transcription (Qiagen, Германия) с использованием протокола производителя.

В результате получали 20мкл кДНК, которую хранили при -20°C . Детекцию мРНК маммаглобина проводили методом двухступенчатой ПЦР (Nested-PCR) в режиме реального времени на амплификаторе «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия), с применением интеркалирующего красителя SYBRGreen. В качестве матрицы использовали полученную ранее кДНК. Для проведения одной реакции первого шага Nested-PCR использовали 10 мкл. 2,5X реакционной смеси, содержащей KCl, ТрисHCl (pH 8,8), 6,25 mM MgCl₂, Taq ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20,; 1 мкл. MgCl₂ (25 mM) («Syntol», Россия), 7,5 мкл деионизованной воды, 1 мкл. прямого(N1) олигонуклотида (10 pmol), 1 мкл обратного(N2) олигонуклеотида (10 pmol) («Syntol», Россия), 5 мкл образца кДНК.

В первом шаге использовались олигонуклеотиды:

МAM (N1) – 5' GAA GTT GCT GAT GGT CCT CAT GCT GGC 3'

МAM (N2) – 5' CTC ACC ATA CCC TGC AGT TCT GTG AGC 3'

Для проведения одной реакции второго шага Nested-PCR использовали 10 мкл. 2,5X реакционной смеси, содержащей KCl, ТрисHCl (pH 8,8), 6,25 mM MgCl₂, TaqДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты, глицерол, Tween 20, краситель SybrGreen; 1 мкл. MgCl₂ (25 mM) («Syntol», Россия); 7,5 мкл деионизованной воды, 1 мкл прямого(N3) олигонуклеотида (10 pmol), 1 мкл обратного(N4) олигонуклеотида (10 pmol) («Syntol», Россия), 5 мкл. Образца полученного при первом шаге Nested-PCR.

МAM (N3) – 5' CTC CCA GCA CTG CTA CGC AGG CTC 3'

МAM (N4) – 5' CAC CTC AAC ATT GCT CAG AGT TTC ATC CG 3'

Для обоих шагов условия проведения реакции были следующие: в течение 5 минут смесь прогревали при 95⁰С, затем следовало 45 циклов – 15 сек при 95⁰С , 20 сек при 60⁰С, 15 сек при 72⁰С; по окончании смесь охлаждалась до 10⁰С.

Детекция продукта ПЦР. Присутствие специфического ПЦР-продукта (ампликона) детектировалось электрофоретическим разделением ПЦР-амплификационной смеси на окрашенном бромистым этидием агарозном геле. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм. Полосы визуализируют с помощью ультрафиолетового подсвечивания в трансиллюминаторе и последующим фотографированием. Специфичность полосы амплифицированной ДНК подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и ДНК-стандарту. Положительный результат оценивают по расстоянию пробега визуализированной полосы, соответствующему полосе положительного контроля, что свидетельствует о синтезе фрагмента ДНК, равного по размерам положительному контролю.

2.3 Статистическая обработка

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием методов параметрического и непараметрического анализа. Исследованные количественные показатели представляли в виде $Me (L-H)$, где Me – медиана, L – нижний квартиль, H – верхний квартиль. Для сопоставления двух групп по количественным признакам использованы методы непараметрической и параметрической статистики: U -критерий Манна-Уитни, критерий Вилкоксона и T -тест Стьюдента, а также метод дисперсионного анализа ANOVA. Различие групп полагали статистически значимым при $P < 0,05$. Обработку полученных результатов проводили в программном пакете StatSoft Statistica 6. Так как в работе были использованы различные методы многопараметрического анализа считаем целесообразным рассмотреть основные свойства этих методов более подробно.

В последнее время в печати вышло ряд фундаментальных монографий, подробно рассматривающих особенности многомерных методов статистики, поэтому в этом разделе будут рассмотрены только моменты, имеющие принципиальное значение для анализа полученных результатов (Дубров и др. 1998, Флетчер, Флетчер, 1998, Медик и др. 2000, Боровиков, 2001).

Факторный анализ. Основная задача факторного анализа – выделение из множества измеряемых характеристик пациента новых факторов (обобщенных переменных), отражающих свойства объекта более образно.

Главными целями факторного анализа являются:

- (1) сокращение - числа переменных (редукция данных)
- (2) определение структуры - взаимосвязей между переменными, т.е. классификация переменных или обобщение переменных.

Поэтому факторный анализ используется или как метод сокращения данных или как метод классификации.

Первым этапом факторного анализа, как правило, является выбор новых признаков, которые являются линейными комбинациями прежних и "вбирают" в себя большую часть общей изменчивости наблюдаемых данных. Задачи этого этапа выбор такого количества факторов, которое включает большую часть

информации, заключенной в первоначальных наблюдениях. Обычно это вычисляется с помощью метода главных компонент, хотя применимы и другие методы, например, метод максимального правдоподобия. Метод главных компонент по существу сводится к выбору новой ортогональной системы координат в пространстве наблюдений. Основная привлекательность факторного анализа при решении медицинских задач перевод задачи большой размерности, т.е. задачи с большим количеством исследуемых признаков, к новым интегральным показателям – общим факторам, число которых значительно меньше. Следовательно, факторный анализ позволяет проводить классификацию не по исходным признакам, а по интегральным показателям, построенным как линейная комбинация исходных.

Факторный анализ не может заменить кластерный анализ. Необходимо использовать как факторный анализ, так и различные варианты кластерного анализа, при этом новые факторы могут быть удобным объектом для вариантов кластерного анализа.

Дискриминантный анализ. Дискриминантный анализ является одним из методов многомерного статистического анализа. Главной особенностью дискриминантного статистического анализа является обязательное наличие обучающей выборки. В медицинских исследованиях дискриминантный анализ нашел широкое применение. В исследовании показано, что задачи классификации для создания диагностических алгоритмов на основании лабораторных данных пациента могут быть эффективно решены именно с применением дискриминантного метода. Когда имеется два класса объектов, дискриминантный анализ не отличается от множественной регрессии (зависимой переменной является номер группы). Собственно это и есть основной принцип построения дискриминантной функции – как линейной комбинации характеристик объекта (пациента). Если групп несколько, то можно представить себе, что вначале строится дискриминация между группами 1 и 2, затем между 2 и 3, и так далее.

Используются два основных метода дискриминантного анализа: стандартный и пошаговый. В пошаговом методе на каждом этапе оценивается вклад в функцию дискриминации не включенных в модель переменных. Переменная, дающая наибольший вклад, включается в модель, далее система переходит к следующему шагу.

Следует заметить, что умеренные отклонения распределения характеристик объекта от нормального распределения являются допустимыми, т.е. метод не особенно требователен к этой характеристике, так же, как и требование к однородности дисперсий, наблюдаемых переменных. Критерием проверки может служить контрольная выборка, не участвующая в обучении (построении дискриминантных функций). Для проверки и более достоверного подтверждения полученных результатов классификации при анализе медицинских данных рекомендуют проведение проспективных исследований.

Близкими к методам дискриминантного анализа являются методы дисперсионного, кластерного и факторного анализов, а также методы множественной регрессии.

Деревья классификации. Деревья классификации – это метод классификации, позволяющий определять принадлежность объектов к тому или иному классу в зависимости от соответствующих значений признаков, характеризующих объекты. Основная цель методов деревьев классификации – прогнозирование принадлежности наблюдений (объектов) к тому или иному классу на основании значений одной или нескольких переменных. Этот метод один из наиболее важных инструментов используемых при проведении анализа данных на начальном этапе.

Как метод разведочного анализа, или как дополнительное средство, когда все традиционные методы не дают удовлетворительного результата, деревья классификации, по мнению многих исследователей, не знают себе равных. В отличие от дискриминантного анализа, деревья классификации способны выполнять анализ переменных различных типов – категориальных, порядковых, интервальных. Не накладываются какие-либо ограничения на закон

распределения количественных переменных. Метод позволяет анализировать вклады отдельных переменных в процедуру классификации, что важно, для дальнейшего, углубленного анализа данных.

Построение деревьев классификации состоит из трех основных этапов:

оценки необходимой точности прогноза; выбора варианта (закона) ветвления; задание размера дерева.

Цель анализа с помощью метода деревьев классификации - найти максимально эффективную классификацию и переменные, вносящие максимальный вклад в это.

Кластерный анализ. Методы кластерного анализа позволяют разделить (кластеризовать, классифицировать) исследуемые объекты на группы по принципу «похожести» объектов.

Большинство методов кластеризации являются объединительными – они начинают с создания элементарных кластеров, каждый из которых состоит ровно из одного исходного наблюдения (одной точки), а на каждом последующем шаге происходит объединение двух наиболее близких кластеров в один на основании определенных правил. Визуальное изображение процесса объединения кластеров может быть получено с помощью дендрограммы – дерева объединения кластеров. Основной принцип нахождения «похожих» объектов – определение расстояния между ними. Чем ближе объекты в какой-либо системе координат, тем они более «похожи». Собственно, именно математический принцип определения расстояния между объектами отличает различные методы кластеризации. Часто используют обычное евклидово расстояние, т.е., если объект описывается двумя параметрами, то он может быть изображен точкой на плоскости, а расстояние между объектами – это расстояние между точками, вычисленное по теореме Пифагора.

Таким образом, методы кластеризации довольно разнообразны, в них по-разному выбирается способ определения близости между кластерами (и между объектами), а также используются различные алгоритмы вычислений. Следует заметить, что результаты кластеризации зависят от выбранного метода, и эта зависимость тем сильнее, чем менее явно изучаемая совокупность разделяется на

группы объектов. Поэтому результаты кластеризации могут отличаться в зависимости от применяемого метода. Следует иметь в виду, что методы кластерного анализа не дают какого-либо способа для проверки статистической гипотезы об адекватности полученной классификации. С этими целями результаты классификации можно обосновать с помощью методов дискриминантного анализа. Собственно именно такой подход и был использован при построении модели определения молекулярного фенотипа РМЖ, когда первичные данные по экспрессии комплекса генов (количество мРНК в ткани) были кластеризованы различными методами на 4-5 классов, а надежность полученных классов (достоверность их наличия) была подтверждена с помощью дискриминантного анализа (при этом номера классам были присвоены на основании полученных результатов в кластерном анализе).

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (СОБСТВЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ)

Эффективная и экономически рациональная система обследования молочных желез основана на комплексном подходе и включает в себя современные методы лучевой диагностики – рентгенографию, ультразвуковое исследование с доплеровскими методиками, магнитно-резонансную и рентгеновскую компьютерную томографию. Это позволяет увеличить выявляемость I стадии заболевания до 80%, в том числе – благодаря обнаружению непальпируемого раннего рака (Siu A. L. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. doi:10.7326/M15-2886; Raftery, J., 2011; Рожкова Н.И. Маммология.- Нац. Руководство. М: 2016.). Несмотря на это, весьма актуальной остаётся задача ранней диагностики и выбора оптимальной тактики лечения больных РМЖ. Для решения этих задач продолжается поиск, разработка и внедрение различных методов диагностики и прогноза, способных выявлять опухолевые очаги. Сложности своевременной диагностики обусловлены неспецифичностью клинико – рентгено- сонографических проявлений как для доброкачественных, так и для злокачественных заболеваний молочной железы (Рожкова Н.И. и др., 2009). Создание современной рентгеновской и ультразвуковой техники дало возможность разработать новые инвазивные технологии, в частности, пункционную и дрель-биопсию молочной железы, позволяющие получать высокоинформативный материал для цитологического, гистологического и молекулярно-генетического исследования. Это, в большинстве случаев, исключает необходимость проведения секторальных резекций с диагностической целью и дает возможность устанавливать точный диагноз до операции (Siu A. L., Рожкова Н.И., 2016; Yu Y.H., 2010).

Одним из наиболее перспективных направлений для поиска новых маркеров рака молочной железы является использование молекулярно-генетических

методов, среди которых, особое внимание заслуживает изучение органо - и тканеспецифических профилей экспрессии мРНК.

Доказано, что развитие опухоли молочной железы сопровождается рядом генетических изменений (Yager J.D., 2010). Малигнизация ткани молочной железы приводит к качественным и количественным изменениям в экспрессии генов, кодирующих факторы роста и их рецепторы, структурных белков, белков вторичных мессенджеров, и факторов транскрипции. Изучение изменений в экспрессии генов могут помочь найти наиболее информативные из них, которые могли бы послужить надежными маркерами рака молочной железы (Рожкова Н.И., 2016).

В тоже время, изменениям в нормальной ткани органа, в котором развивается злокачественная опухоль, посвящено мало исследований, а эти изменения могут определять такие критические процессы канцерогенеза как инвазия и метастазирование (Wiseman B.S., 2002). Поэтому, наравне с исследованием молекулярно-генетических отличий ткани опухоли, нами были проведены исследования морфологически не измененной ткани молочной железы, в которой развился патологический процесс. Для этого был проведен сбор образцов ткани как из патологического очага (доброкачественные процессы МЖ, РМЖ), так и из участков морфологически не измененной «нормальной» ткани (НТ) МЖ удаленных от патологического очага на расстояние более 5 см. Ниже приводятся результаты сравнительной оценки экспрессии генов в образцах морфологически неизмененной ткани, ткани фиброаденомы и рака молочной железы.

3.1 Анализ уровня экспрессии генов в зависимости от типа ткани

3.1.1 Сравнение морфологически неизмененной ткани (НТ) и ткани рака молочной железы (РМЖ)

Нами было проанализирована экспрессия 17 генов в 208 образцах ткани молочной железы. Сравнивались уровни экспрессии генов в тканях рака,

фиброаденомы и неизменной молочной железы. В исследование были включены образцы ткани рака молочной железы (n=69), образцы фиброаденомы молочной железы (n=41) и образцы неизменной ткани молочной железы (n=98). Средний возраст пациенток, составляющих группу РМЖ - 57,2 года; средний возраст пациенток, составляющих группу ФА – 33,1 год. Распределение образцов по типу ткани приведено в таблице 3.1.

Таблица 3.1 — Распределение взятых в исследование образцов по типу ткани

Тип ткани/количество образцов	ФА	РМЖ	Всего
Норма	30	68	98
ФА	41	0	41
РМЖ	0	69	69
Всего	71	137	208

Частота гистологических нозологий включенных в исследование фиброаденом представдена в таблице 2.2 (раздел. Материалы и методы исследования)

Распределение образцов по гистологическому типу РМЖ (ИП-инфильтративный протоковый рак, ИД-инфильтративный дольковый рак) представлено в таблице 3.2

Таблица 3.2 — Частота гистологической принадлежности образцов РМЖ.

Тип РМЖ	Частота	Кумул.	Процент
смешанный	3	3	4,3
ИД	13	16	18,8
ИП	44	60	63,8
Прочие	5	65	7,2
Слизистый	4	69	5,8

Распределение образцов по наличию отдаленного метастазирования (М) отражено в таблице 3.3

Таблица 3.3 — Частота отдаленного метастазирования, M(MTS).

	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
0	64	64	92,8	92,8
1	4	68	5,8	98,6
2	1	69	1,4	100,0
Всего		69		100,0

Распределение образцов данной группы по наличию регионарного метастазирования (N) представлено в таблице 3.4.

Таблица 3.4 — Частота регионарного метастазирования (N).

	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
0	41	41	59,4	59,4
1	15	56	21,7	81,2
2	9	65	13,0	94,2
3	4	69	5,8	100,0
Всего		69		100,0

Распределение образцов данной группы в зависимости от размера опухоли (T) представлено в таблице 3.5.

Таблица 3.5 — Частота распределения опухолей по размеру (T).

T	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
1	25	25	36,2	36,2
2	28	53	40,6	76,8
3	3	56	4,3	81,2
4	13	69	18,8	100,0
Всего		69		100,0

Образцы данной группы имели результаты ИГХ по следующим показателям: PЭ, PП, c-erb-B2, амплификация HER2, результаты которых представлены в таблицах 3.6-3.9.

Таблица 3.6— Частота обнаружения РЭ (метод ИГХ).

ЭР	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
отр	24	24	34,78261	34,7826
пол	45	69	65,21739	100,0000
Пропущ.	0	69	0,00000	100,0000

Таблица 3.7 — Частота обнаружения РП (метод ИГХ).

РП	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
отр	27	27	39,13043	39,1304
пол	42	69	60,86957	100,0000
Пропущ.	0	69	0,00000	100,0000

Таблица 3.8 — Частота обнаружения экспрессии c-erbB2 (метод ИГХ).

c-erbB2	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
1	30	30	43,47826	43,4783
2	29	59	42,02899	85,5072
3	10	69	14,49275	100,0000
Пропущ.	0	69		100,0000

Таблица 3.9 — Частота амплификации Her2-neu (FISH).

Her2-neu	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
нет	28	28	40,57971	40,5797
есть	10	38	14,49275	55,0725
Пропущ.	31	69	44,92754	100,0000

Результаты сравнительного анализа экспрессии исследованных генов в группах РМЖ-ФА-нормальная ткань молочной железы приведены в таблицах 3.10 - 3.14.

Из результатов, приведенных в таблице 3.10 видно, что в тканях РМЖ и ФА достоверно отличаются уровни экспрессии таких генов, как Ki-67, Aurca, Birc5, CCNB1, MMP1, HER2 neu, BCL2, NDRG, PTEN.

При сравнении групп: рак молочной железы – неизменная ткань МЖ получены достоверные отличия в уровне экспрессии мРНК генов: Ki-67, Aurca, Birc5, CCNB1, MMP1, GRB7, BCL2, NDRG, ESR, PTEN. Для группы ФА – неизменная ткань МЖ достоверные отличия получены только для уровня экспрессии мРНК гена MMP11. В группе неизменная ткань МЖ для больных с фибroadеномой и неизменная ткань МЖ для больных с раком молочной железы уровни экспрессии достоверно отличаются у двух генов: MMP1, PRG.

Таблица 3.10 — Достоверность отличий экспрессии генов на основании рангового дискриминантного анализа Краскелла-Уоллиса.

Показатель\Группы	PMЖ-ФА	PMЖ-норма (PMЖ)	ФА-норма (ФА)	Норма (ФА)-Норма (PMЖ)
Ki-67	0.0001*	0,0000*	0,3272	0,2006
Aurca	0.0018*	0,0000*	0,1416	0,7156
Birc5	0.0001*	0,0000*	0,1025	0,1558
CCNB1	0.0006*	0,0000*	0,5676	0,4217
MMP11	0.0003*	0,0000*	0,0044*	0,0210*
CTSL2	0.1258	0,1492	0,5136	0,2583
HER2 neu	0.0176*	0,4392	0,7903	0,0531
GRB7	0.6470	0,0004*	0,7324	0,0945
BCL2	0.0215*	0,0001*	0,7903	0,9033
BAG	0.0848	0,2931	0,6761	0,3359
BAX	0.2116	0,0180*	0,4624	0,3849
NDRG	0.0111*	0,0000*	0,3051	0,6337
ESR	0.8881	0,0098*	0,1208	0,6606
PRG	0.0942	0,2523	0,4704	0,0466*
PTEN	0.0128*	0,0002*	0,8494	0,9330
MGB1	0.3383	0,0116*	0,092*	0,3423
TERT	0.0651	0,0667	0,1213	0,1131

* - достоверность отличий $p < 0.05$

При анализе с помощью критерия Стьюдента между группами PMЖ – ФА получены достоверные отличия для генов Ki-67, Aurca, Birc5, MMP1, NDRG (Таблица 3.11).

Таблица 3.11 — Достоверность отличий на основании Т-критерия Стьюдента между средними значениями уровней экспрессии мРНК генов в ткани РМЖ и ФА.

	Среднее РМЖ	Среднее ФА	t-знач.	p
Ki67	117,57	22,77	2,87467	0,005461*
Aurca	240,07	56,89	2,04160	0,045255*
Birc5	119,22	17,03	2,06251	0,043223*
CCNB1	55,32	14,88	1,92643	0,058425
MMP11	250,24	19,78	2,04244	0,045106*
CTSL2	38,07	31,22	0,18230	0,855916
Her2 neu	42,05	45,70	-0,13418	0,893667
GRB7	1992,17	532,13	0,90152	0,370588
BCL2	38,55	54,09	-1,75487	0,083922
BAG	5,05	5,27	-0,15122	0,880266
BAX	24,39	18,22	1,40995	0,163323
NDRG	159,71	339,10	-2,52865	0,013849*
ESR	378,35	291,22	0,61081	0,543454
PRG	4244,15	5346,91	-0,55017	0,584063
PTEN	7,35	9,17	-1,83319	0,071284
MGB1	91648,82	33112,46	0,97028	0,335447
TERT	32,14	4,29	0,63149	0,530918

Между группами - неизменная ткань МЖ больных с фиброаденомой и неизменная ткань МЖ больных раком молочной железы, получены достоверные отличия экспрессии следующих генов: CTSL2, Her2 neu, BAG , PRG (Таблица 3.12). Эти гены относятся к разным группам, контролирующим различные клеточные процессы. Her2neu и PRG рецепторы, участвующие в контроле пролиферации, CTSL2 – ген катепсина, условно отнесенный нами к группе контроля межклеточного взаимодействия, а ген BAG - активатор апоптоза.

Таблица 3.12 — Достоверность отличий средних значений уровней экспрессии мРНК генов в ткани неизменная ткань РМЖ – неизменная ткань ФА на основании Т-критерия Стьюдента.

	нормальная ткань при ФА	нормальная ткань при РМЖ	t-знач.	p
Ki67	26,49	14,67	1,63177	0,107640
Aurca	32,38	43,81	-1,08400	0,282430
Birc5	8,81	19,14	-1,19867	0,235218
CCNB1	13,54	10,41	1,09096	0,279380
MMP11	3,91	13,16	-0,85063	0,398148
CTSL2	47,61	20,91	2,08043	0,041494*
Her2 neu	68,56	27,54	2,21013	0,030679*
GRB7	737,59	390,29	1,86854	0,066265
BCL2	63,40	65,40	-0,08739	0,930634
BAG	6,52	4,37	2,72975	0,008177*
BAX	15,13	21,46	-1,06878	0,289185
NDRG	494,41	494,73	-0,00202	0,998397
ESR	146,91	165,12	-0,24411	0,807927
PRG	4293,01	1995,70	2,27368	0,026349*
PTEN	10,63	11,45	-0,31497	0,753810
MGB1	38757,52	22840,57	1,23841	0,220158
TERT	22,79	16,84	0,35429	0,725518

В таблице 3.13 представлены результаты сравнения экспрессий исследуемых генов в группах не измененная ткань при ФА – ткань ФА, получено, что достоверно отличается только экспрессия гена MMP11- гена контролирующего экспрессию металлопротеиназы, гена участвующего в клеточной локомоции, а для клеток злокачественных опухолей его экспрессия необходима для реализации метастатического потенциала.

Таблица 3.13 — Достоверность отличий средних значений уровней экспрессии мРНК генов в ткани неизмененная ткань ФА и ткани ФА на основании Т-критерия Стьюдента.

	нормальная ткань при ФА	Ткань ФА	t-знач.	P
Ki67	26,49	22,77	0,30095	0,767105
Aurca	32,38	56,89	-1,92616	0,070974
Birc5	8,81	17,03	-1,54619	0,140471
CCNB1	13,54	14,88	-0,32140	0,751826
MMP1	3,91	19,78	-2,84015	0,010859*
CTSL2	47,61	31,22	0,60707	0,551828
Her2 neu	68,56	45,70	0,99148	0,334595
GRB7	737,59	532,13	0,78945	0,440124
BCL2	63,40	54,09	0,70883	0,487508
BAG	6,52	5,27	0,78660	0,441749
BAX	15,13	18,22	-0,80090	0,434240
NDRG	494,41	339,10	1,22058	0,237995
ESR	146,91	291,22	-1,74676	0,098720
PRG	4293,01	5346,91	-0,53038	0,602334
PTEN	10,63	9,17	0,91813	0,370693
MGB1	38757,52	33112,46	0,26767	0,791993
TERT	22,79	4,29	11,89129	0,006998

При сравнении групп ткань опухоли РМЖ – не измененная ткань при РМЖ достоверные отличия в уровне экспрессии наблюдались для генов Ki-67, Aurca, Birc5, CCNB1, MMP1, GRB7, BCL2, NDRG, ESR, PRG, MGB1, PTEN (Таблица 3.14).

Таблица 3.14 - Достоверность отличий уровней экспрессии мРНК генов для групп ткань опухоли РМЖ – не измененная ткань при РМЖ на основании Т-критерия Стьюдента

	Не измененная ткань при РМЖ	ткань опухоли РМЖ	t-знач.	P
Ki67	14,67	117,57	-7,41232	0,000000*
Aurca	43,81	240,07	-5,23048	0,000001*
Birc5	19,14	119,22	-4,70824	0,000007*
CCNB1	10,41	55,32	-5,11175	0,000001*
MMP1	13,16	250,24	-4,79476	0,000005*
CTSL2	20,91	38,07	-1,08185	0,281643
Her2 neu	27,54	42,05	-1,08420	0,280606
GRB7	390,29	1992,17	-2,25741	0,025921*
BCL2	65,40	38,55	2,80713	0,005897*
BAG	4,37	5,05	-1,04485	0,298342
BAX	21,46	24,39	-1,01004	0,314655
NDRG	494,73	159,71	5,02562	0,000002*
ESR	165,12	378,35	-3,28212	0,001374*
PRG	1995,70	4244,15	-2,49081	0,014212*
PTEN	11,45	7,35	3,80177	0,000234*
MGB1	22840,57	91648,82	-2,56523	0,011645*
TERT	16,84	32,14	-1,31459	0,192709

Результаты проведенного исследования уровней экспрессии анализируемых генов показали, что для генов Ki-67 и CCNB1 в ряду нормальная ткань-фиброаденома – РМЖ наблюдается увеличение экспрессии генов с достоверными отличиями между группами ФА-РМЖ. Результаты, полученные методами статистической обработки представлены на рисунках 3.1-3.2.

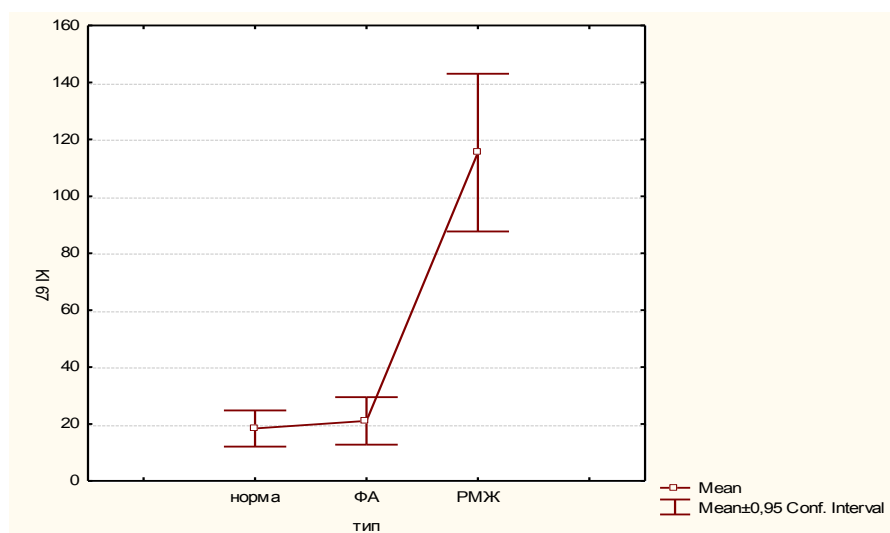


Рисунок 3.1 — Средние значения и 95% интервал уровня экспрессии мРНК гена *Ki67* в нормальной ткани молочной железы, в ткани фибroadеномы и в ткани РМЖ.

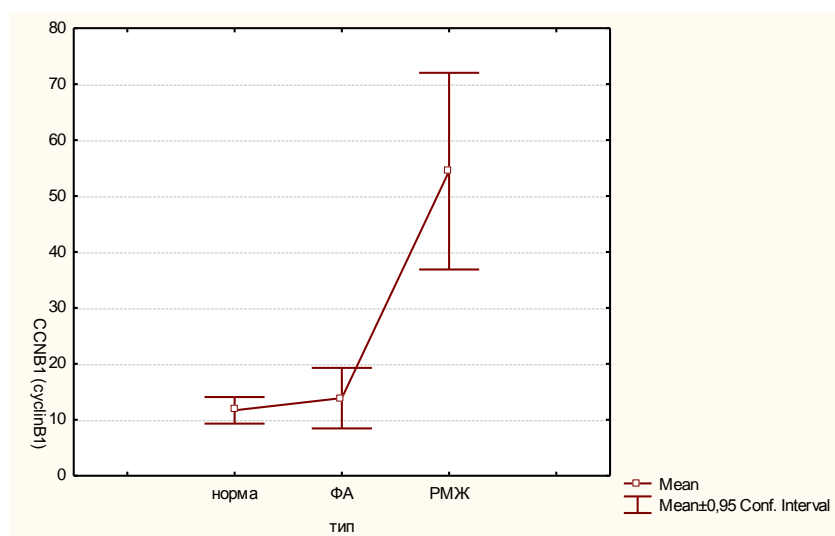


Рисунок 3.2 — Средние значения и 95% интервал уровня экспрессии мРНК гена циклина В (*CCNB1*) в нормальной ткани молочной железы, в ткани фибroadеномы и в ткани РМЖ.

Подобный вид имеют и графики для генов *Aurca*, *VIRC5*, *MMP1*, *MGB1* — т.е. генов, контролирующих пролиферацию и дифференцировку, а именно — резкое увеличение уровня их экспрессии при РМЖ.

Результат проведенного исследования уровней экспрессии генов показал, что для генов *BCL2* и *NDRG1* в ряду нормальная ткань - фибroadенома – РМЖ наблюдается уменьшение экспрессии генов с достоверными отличиями между группами ФА-РМЖ (рисунки 3.3-3.4).

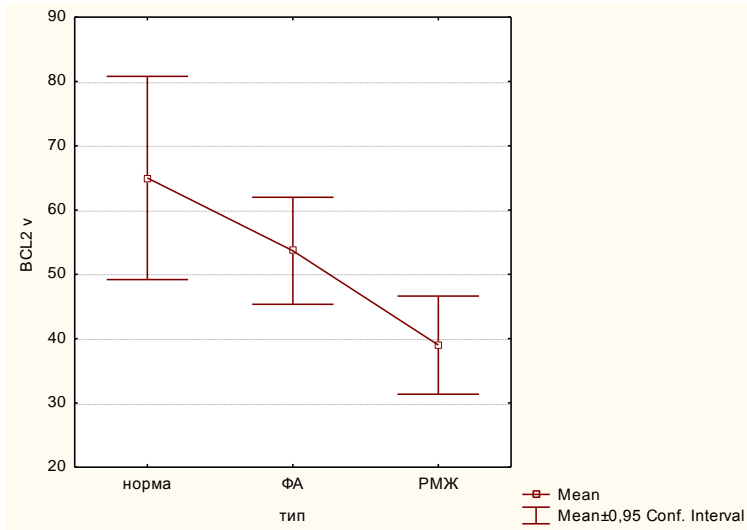


Рисунок 3.3 — Средние значения и 95% интервал уровня экспрессии мРНК гена *BCL2* в нормальной ткани молочной железы, в ткани фибroadеномы и ткани РМЖ.

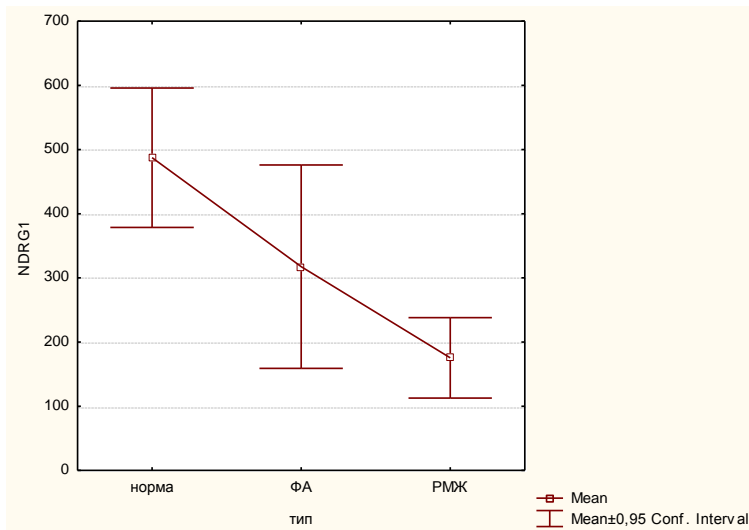


Рисунок 3.4 — Средние значения и 95% интервал уровня экспрессии мРНК гена *NDRG1* в нормальной ткани молочной железы, в ткани фибroadеномы и ткани РМЖ.

Для генов, контролирующих апоптоз обнаружен принципиально другой характер зависимости – уровень их экспрессии снижается при ФА и еще более

при РМЖ. Обнаруженные закономерности были положены в основу формирования диагностической панели биомаркеров.

3.1.2 Определение оптимальной панели биомаркеров для диагностики и прогноза заболеваний молочной железы. Алгоритм применения полученной панели генов при обследовании пациенток с патологией молочной железы.

Полученные достоверные данные отличий в уровнях экспрессий генов Ki67, Aurca, BIRC5, CCNB1, MMP11, MGB1 позволяют провести дифференциальную диагностику РМЖ и ФА. Эти же гены можно использовать для исключения/подтверждения диагноза РМЖ (уровень экспрессии достоверно отличается от уровня экспрессии в неизмененной ткани и ткани ФА). В качестве количественной меры для дифференциальной диагностики злокачественных и доброкачественных процессов в молочной железе можно рекомендовать использовать уровень двукратного превышения экспрессии генов Ki67, Aurca, BIRC5, CCNB1, MMP11, MGB1 относительно средних значений, полученных для группы ФА. Дополнительными критериями могут быть снижение уровней экспрессии генов BCL2 и NDRG1.

Интеграция молекулярно-генетических исследований в дифференциально-диагностический комплекс. Молекулярно-генетические методы широко используются в таких областях медицины как диагностика инфекционных заболеваний, перинатальная диагностика и онкология, поэтому, актуальной задачей является интеграция классических, клинико-радиологических методов диагностики и современных молекулярно-биологических технологий.

В нашем исследовании было проведено комплексное клинико-рентгено-сонографических обследование пациенток различными патологиями молочной железы, которое было дополнено молекулярно-генетическим анализом уровня экспрессии мРНК комплекса генов. Клинико-радиологическое обследование включало: сбор анамнеза, пальпаторное обследование, рентгенологическое исследование молочных желез, ультразвуковое исследование, включая методики радиальной протоковой эхографии и соноэластографии, термографию и при

показаниях, дуктографию. В тоже время, референсным, определяющим, в постановке диагноза заболевания молочной железы являлся гистологический метод исследования ткани. Для выявления взаимосвязи клинико-радиологических и молекулярно-генетических характеристик образований была использована также группа образцов ткани молочной железы (N=208, где ткани рака молочной железы (n=69), образцы фиброаденомы молочной железы (n=41) и образцы не измененной ткани молочной железы (n=98)).

При описании образования в молочной железе использовались такие рентгенологические характеристики, как: форма обнаруженного образования (бугристая, округлая, неровная, овоидная); наличие пальпаторно определяемого узла, наличие отека железы, фиброзно-кистозная мастопатия, фиброзно жировые изменения, наличие микрокальцинатов и макрокальцинатов, перестройка структуры ткани, наличие кист, диффузные изменения, изменение кровотока.

При проведении клинико-радиологического обследования полученные результаты не всегда позволяют точно поставить диагноз. Эффективность методов визуализации составляет 81-86% для различных патологий молочной железы (Рожкова Н.И., 2016). В нашем исследовании процент поставленных диагнозов на основании клинико-радиологического исследования, совпавших с гистологическим заключением составил 81%. Следует отметить, что часть случаев «не совпадения» диагноза таковыми не являются, а связаны с объективной невозможностью обнаружить и описать существующее образование, например, в случаях рентген негативного или непальпируемого образования поэтому, в целях повышения диагностической эффективности существующего клинико-радиологического комплекса необходимо введение дополнительных исследований. Для решения этой задачи нами был проведен сравнительный анализ клинико-радиологических и молекулярно-биологических показателей молочной железы. Были проанализированы найденные корреляционные связи между клинико-радиологическими и молекулярно-биологическими показателями.

Клинико-радиологические характеристики изменений в молочной железе имеют множественные корреляционные связи внутри группы, однако наиболее

интересна взаимосвязь этих показателей с молекулярно-биологическими изменениями.

Так, для группы пациенток с диагнозом рак молочной железы обнаружено, что:

- наличие макрокальцинатов имеет прямую корреляционную связь (0,35, $p < 0.05$) с наличием кисты в опухолевом узле;
- наличие микрокальцинатов имеет прямые корреляционные связи с отеком железы и экспрессией м РНК гена HER-2/new соответственно: (0,28, $p < 0.05$), (0,38, $p < 0.05$);
- наличие отека молочной железы имеет множественные прямые корреляционные связи с перестройками структуры ткани (0,64, $p < 0.05$), диффузными изменениями в ткани (0,67, $p < 0.05$), увеличенным кровоснабжением (0,39, $p < 0.05$), и увеличенной экспрессией мРНК гена BIRC5 (0,27, $p < 0.05$);
- наличие увеличенных лимфоузлов имеет прямые корреляционные связи с диффузными изменениями (0,27, $p < 0.05$) и увеличенной экспрессией мРНК гена BIRC5 (0,27, $p < 0.05$);
- наличие фиброзно-жировых инволюция характеризуется повышенной экспрессией гена пролиферации Ki-67. Их корреляционная связь - (0,30, $p < 0.05$);
- фиброзно-кистозные изменения имеют обратную корреляционную связь с экспрессией м РНК гена Ki-67 (-0,28, $p < 0.05$).

Корреляционный анализ был проведен и для группы с установленным диагнозом фиброаденома, обнаружены следующие корреляционные связи:

- пальпаторно определяемым узлом и уровнем экспрессии мРНК гена BAG (0,70, $p < 0.05$);
- наличием кисты в образовании и повышенной экспрессией мРНК BIRC5 (0,65, $p < 0.05$);
- визуализированным увеличенным кровотоком и повышенной экспрессией мРНК проапоптоического гена BAX (0,62, $p < 0.05$).

Таким образом, корреляционный анализ выявил незначительное количество достоверных связей между клинико-радиологическими и молекулярно-генетическими признаками, это может говорить о том, что эти признаки независимы и молекулярно-генетические характеристики могут дать дополнительную информацию для дифференцировки патологических процессов в молочной железе. Для выяснения этого вопроса мы проанализировали 19 случаев, для которых по данным клинико-радиологического исследования был поставлен неправильный диагноз, или диагноз поставить не удалось. Из этих 19 случаев для 16, по данным гистологического исследования был поставлен диагноз РМЖ, а в трех случаях – ФА. Результаты молекулярно-генетических данных для этих случаев приведены в таблице 3.15.

Таблица 3.15 — Примеры образцов с несовпадением клинико-радиологического и гистологического диагнозов.

№	Номер образца	Диагноз гист.	KI 67	Aurca (STK15)	BIRC5 (survivin)	CCNB1 (cyclinB1)	MMP11 (stromolysin3)	MGB1
1	3	РМЖ	<u>48,84</u>	<u>98,36</u>	34,06	15,78	<u>377,41</u>	<u>88139,43</u>
2	42	РМЖ						1176,27
3	51	РМЖ						55,72
4	53	РМЖ						1176,30
5	55	РМЖ	6,19	26,72	1,88	8,88	14,22	<u>65422,53</u>
6	58	РМЖ	<u>162,02</u>	<u>215,27</u>	<u>109,14</u>	<u>42,52</u>	<u>46,53</u>	<u>671719,79</u>
7	98	РМЖ	<u>94,35</u>	<u>82,71</u>	28,64	20,11	91,14	<u>28084,76</u>
8	107	РМЖ	<u>286,03</u>	<u>367,09</u>	<u>173,65</u>	<u>106,15</u>	19,16	665,13
9	112	РМЖ	<u>159,79</u>	<u>1584,71</u>	<u>315,17</u>	<u>78,25</u>	<u>484,38</u>	1207,24

Продолжение таблицы 3.15

10	115	PMЖ	<u>146,52</u>	<u>90,82</u>	<u>88,95</u>	16,74	30,80	5843,03
11	120	ФА						64,00
12	130	PMЖ	35,51	62,25	47,84	25,46	59,71	<u>187625,97</u>
13	134	PMЖ	<u>71,51</u>	<u>109,14</u>	<u>59,30</u>	20,82	<u>286,03</u>	<u>498591,93</u>
14	142	PMЖ	<u>42,81</u>	95,67	<u>32,00</u>	20,97	<u>67,18</u>	6829,20
15	150	PMЖ	30,91	79,34	36,25	30,27	27,86	<u>609598,57</u>
16	172	ФА	26,54	35,26	12,64	17,15	53,08	5585,61
17	173	ФА	18,38	30,06	6,87	11,47	4,00	23453,25
18	182	PMЖ	<u>176,07</u>	<u>190,02</u>	<u>57,28</u>	26,54	<u>2368,90</u>	<u>60201,01</u>
19	186	PMЖ	<u>162,02</u>	<u>187,40</u>	<u>154,34</u>	<u>47,18</u>	<u>122,79</u>	21731,50

Таблица 3.16 — Средние значения экспрессии генов, вошедших в диагностическую панель для групп PMЖ и ФА.

	Среднее для PMЖ	Среднее для ФА	t-value	p
MGB1(маммаглобин)	77683,78	13120,05	2,244351	0,026849
Ki 67	115,34	21,10	2,972018	0,004125
Aurca (STK15)	230,16	52,54	2,093814	0,040122
BIRC5 (survivin)	113,66	15,96	2,090608	0,040478
CCNB1 (cyclinB1)	54,45	13,89	2,016180	0,047854
MMP11 (stromolysin3)	237,78	18,51	2,051907	0,044090

Анализ таблиц 3.15 и 3.16 позволяет сформулировать простое правило: для ткани PMЖ характерно повышение экспрессии как минимум 1 из генов из списка Ki67, Aurca, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1(маммаглобин) (повышенные значения подчеркнуты). Это правило позволяет достоверно поставить диагноз для 15 из 19 не диагностируемых клинико-радиологическими методами случаев.

Таким образом, молекулярно-биологическое исследование образца ткани молочной железы, включающее определение уровня экспрессии таких генов, как Ki67, Aurca, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1, позволяет с достоверностью 79% отличить доброкачественную и злокачественную ткань молочной железы в случаях, когда постановка диагноза клинико-радиологическими методами

затруднена. Включение этих исследований в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики с 81 до 96%.

Мы также провели сравнение молекулярно-генетических данных для групп с диагнозом нормальная ткань - ФА - РМЖ методами многопараметрического анализа: дискриминантным, кластерным и др. Так, эффективность классификации между тканью РМЖ и нормальной на основе дискриминантного анализа составляет 98%. Интересные результаты были получены при дискриминантном анализе молекулярно-генетических данных для ткани ФА. Оказалось, что все образцы ФА делятся на два различных класса – один из которых по таким характеристикам, как активность пролиферации и уровень экспрессии маркеров апоптоза близок к нормальной ткани молочной железы, а второй класс по этим характеристикам близок к ткани РМЖ. Т.е молекулярно-генетические характеристики ткани ФА не образуют самостоятельного кластера и могут, по-видимому, быть разделены на прогностически благоприятную группу, с низким уровнем пролиферации и неблагоприятную – с высоким уровнем пролиферации клеток и началом нарушения контроля апоптоза. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят более точно ответить на этот вопрос.

Таким образом, исследование молекулярно-биологических маркеров при заболеваниях МЖ, может не только помочь в постановке правильного диагноза, но и быть дополнительным фактором прогноза течения для доброкачественных заболеваний молочной железы. Сочетанное использование молекулярно-биологических и клинико-радиологических методов при диагностике заболеваний МЖ повышает диагностическую эффективность до 96%.

Алгоритм использования молекулярно-генетических исследований уровня экспрессии мРНК генов. После получения биопсийного, операционного материала, или жидкости из образования, проводится определение уровня экспрессии генов Ki67, Aurca, BIRC5, CCNB1, MMP11, MGB1. Параллельно проводится цитологическое или гистологическое исследование полученного материала.

1. При получении заключения о злокачественной природе процесса по данным морфологических методов далее поступают, согласно приведенным алгоритмам – к проведению лечения соответствующей нозологической формы.

2. При получении морфологического заключения о доброкачественной природе процесса или «не информативности» полученного материала анализируют данные молекулярно-генетических исследований. В случае увеличения экспрессии одного и более генов из группы: Ki67, Aurca, BIRC5, CCNB1, MMP11, MGB1 в два более раза по сравнению со средними значениями приведенными в таблице 3.16 для группы фиброаденом делается заключение о возможной злокачественной природе процесса и назначается проведение повторного забора биопсийного материала (а в случае операционного материала более тщательное его исследование). При многократном получении неинформативных морфологических исследований может быть дана рекомендация на проведение минимального хирургического вмешательства со срочным гистологическим исследованием или проведение динамического наблюдения с периодичностью не реже раза в 3 месяца.

Эффективность предлагаемой технологии заключается в возможностях использования новых технологий на основе комплексирования радиологических и молекулярно-биологических методов с целью дифференциальной диагностики заболеваний молочной железы и последующего динамического мониторинга. Разработанная технология позволяет проводить качественную и количественную оценку состояния тканей молочной железы и повысить информативность клинико-радиологического комплекса.

3.2 Анализ уровня экспрессии генов в зависимости от клинико-морфологических характеристик опухоли рака молочной железы

Следующей задачей было исследование зависимостей уровней экспрессии комплекса проанализированных генов от морфологических особенностей опухоли: размеров, наличия метастазов, степени злокачественности и других, клинически важных характеристик.

3.2.1 Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от морфологической характеристики опухоли

Сравнительный анализ экспрессии генов по критерию морфологического строения опухоли был ограничен группами образцов инфильтративного долькового рака (ИДР) и инфильтративного протокового рака (ИПР). Статистически значимых отличий уровней экспрессии генов получено не было (таблица 3.17). Определенные тенденции наблюдались в отношении маркеров пролиферации KI67, CCNB1, ингибиторов апоптоза BAG1, экспрессия которых была повышена в образцах инфильтративного протокового рака. В группе ИПР, в свою очередь, наблюдалась тенденция более высокого уровня экспрессии матриксной металлопротеиназы MMP11.

Таблица 3.17 — Отличия экспрессии генов в образцах РМЖ зависимости от морфологического строения опухоли (инфильтративный дольковый – инфильтративный протоковый рак)

Наименование гена/значение	ИП	ИД	df	p
KI 67	129,8	73,8	45	0,107814
CCNB1	64,7	25,2	45	0,098193
MMP11 (stromolysin3)	194,7	415,0	45	0,101091
BAG	4,6	3,1	45	0,115089

В целом, уровень экспрессии генов в ткани опухоли с различным морфологическим строением отражает тенденцию повышенной пролиферативной (экспрессия KI67 и CCNB1) и антиапоптотической активности (экспрессия BAG1 и BIRC5) в образцах инфильтративного протокового рака. Таким образом, полученные результаты соответствуют современным клиническим наблюдениям, констатирующим, что по клиническому течению эти морфологические формы РМЖ не имеют существенных отличий.

3.2.2 Анализ экспрессии генов в зависимости от размеров опухоли (показатель T по классификации TNM)

Результаты анализа зависимости уровня экспрессии генов в ткани опухоли от ее размеров показаны в таблице 3.18. В таблице приведены только значения уровней экспрессии для генов с достоверными отличиями в группах. Наибольшее количество статистически значимых отличий экспрессии было обнаружено при сравнении групп T1 - T2.

Таблица 3.18 — Сравнение средних значений уровня экспрессии генов в зависимости от размеров опухоли в образцах РМЖ.

	Среднее для T1	Среднее для T2	p
STK15	105,0	325,63	0,00897*
BIRC5	59,5	136,45	0,00738*
CCNB1	29,3	71,27	0,02561*
BCL2	47,8	29,53	0,04139*
PTEN	8,1	6,08	0,04463*

* отличия высоко достоверны.

Анализ результатов приведенных в таблице показывает, что увеличение размеров опухоли сопровождается статистически значимым повышением экспрессии генов STK15 и CCNB1 контролирующих пролиферацию и снижением экспрессии опухолевого супрессора PTEN. В группе генов контролирующих апоптоз отмечается повышение экспрессии BIRC5 и снижение экспрессии BCL2. Оба последних белка являются антиапоптотическими и их разнонаправленные изменения могут указывать на нарушение контроля апоптоза в процессе опухолевой прогрессии.

3.2.3 Анализ экспрессии генов в зависимости от наличия метастатических лимфоузлов (показатель N по классификации TNM)

Сравнение зависимости уровня экспрессии комплекса генов от степени лимфогенного метастазирования показал, что группы N0 и N1 не имеют

достоверных отличий по анализируемым генам. Достоверные отличия появляются при сравнении групп N0 и N2. При этом отличаются экспрессии генов CCNB1, BAX, BIRC5, CTSL2, MMP11, C-erbB2 (Her2/neu) (таблица 3.19).

Таблица 3.19 — Отличия экспрессии генов в образцах РМЖ зависимости от наличия/отсутствия лимфогенных метастазов

	Среднее для N0	Среднее для N2	t-value	df	p
BIRC5	85,1	246,41	-2,42533	37	0,02029
CCNB1	43,4	96,01	-2,02019	37	0,05064
MMP11	169,9	440,78	-1,74769	37	0,08881
CTSL2	23,9	137,06	-2,10686	37	0,04197
HER-2/neu	37,7	109,09	-1,80311	37	0,07952
BAX	21,1	31,99	-2,09439	37	0,04313

В образцах N2 повышена экспрессия маркера пролиферации CCNB1, ингибитора каспаз BIRC5, проапоптотического гена Bax, рецептора эридермального фактора роста C-erbB2, а также протеолитических ферментов MMP11 по сравнению с N0. Сравнение этих отличий с отличиями в экспрессии генов при увеличении размеров опухоли от T1 к T2 показывает, схожие изменения – увеличение уровня экспрессии того же комплекса генов, контролирующих пролиферацию: BIRC5, CCNB1, Her-2/neu, нарушение контроля апоптоза – снижение экспрессии проапоптотического белка Bax. Однако имеются существенные отличия, отражающие, по-видимому, важный патогенетический механизм увеличения метастатического потенциала опухоли – резкое увеличение экспрессии тканевых протеаз – MMP11 и CTSL2, которые позволяют опухолевой клетке разрушать тканевую, соединительно-тканый матрикс и увеличивать мобильность клеточных элементов.

Такие морфологические признаки как размер опухоли, наличие лимфогенных и гематогенных метастазов являются независимыми факторами прогноза, а отличия экспрессии генов при сравнении по этим признакам представляются вполне логичными. Чтобы минимизировать влияние этих

признаков на результаты дальнейшего исследования экспрессии генов, сравнительный анализ проводился в группах I-II стадии РМЖ.

3.2.4 Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от статуса рецепторов

Для всех образцов, иммуногистохимическим методом, был определен рецепторный статус опухоли: ЭР, ПР, Her2/neu и определен уровень экспрессии исследуемых генов в этих группах. Результаты анализа экспрессии генов в зависимости от рецепторного статуса представлены в таблицах 3.20 – 3.22.

Таблица 3.20 — Сравнение средних значений уровней экспрессии генов в группах ЭР - и ЭР + РМЖ.

Наименование гена/значение	ЭР -	ЭР +	df	p
BIRC5	167,7	88,1	54,0	0,07 У
CTSL2 (cathepsin L2)	78,5	17,9	55,0	0,07
GRB7	3944,4	1015,3	55,0	0,05*
BCL2	28,2	44,4	55,0	0,04*
BAG	3,6	5,8	55,0	0,10
NDRG1	260,5	132,9	55,0	0,05*
ESR	141,6	492,2	55,0	0,00
PRG	1819,2	5452,2	55,0	0,04*

Анализ полученных результатов показывает, что эстроген отрицательные опухоли имеют достоверно более высокие уровни экспрессии генов GRB7 и NDRG1, тенденцию к увеличению генов BIRC5 и CTSL2 (cathepsin L2) и достоверное снижение уровня экспрессии гена BCL2.

Результаты аналогичного анализа для прогестерон положительных и прогестерон отрицательных групп представлены в таблице 3.21.

Таблица 3.21 — Отличия средних значений уровней экспрессии генов в группах в группах ПГ+ и ПГ- РМЖ .

Наименование гена/значение	ПГ+	ПГ-	df	p
STK15	182,67	311,6	55	0,09
CTSL2 (cathepsin L2)	17,98	72,5	55	0,09
CerbB2 (HER-2/new)	19,76	81,4	55	0,01*
GRB7	593,66	4388,2	55	0,01*
BAX	21,58	28,5	55	0,06
NDRG1	151,59	216,3	55	0,32
ESR	521,62	124,6	55	0,00
PRG	6167,41	939,1	55	0,00
TERT	14,56	67,5	42	0,01*

Значимые отличия экспрессии генов между ПГ+ и ПГ- получены для генов GRB7, CerbB2 и TERT, прогестерон отрицательные опухоли имеют достоверное увеличение экспрессии данных генов и тенденции к увеличению экспрессии генов STK15, CTSL2, BAX.

Сравнение уровней экспрессии генов в ткани РМЖ группах с наличием или отсутствием амплификации гена Her2/neu показал, что они существенно отличаются по активности ряда генов (таблица 3.22). Прежде всего, обращает внимание, что в группе с амплификацией, уровень экспрессии гена Her2/neu, хотя и увеличен более чем в 2 раза, отличия экспрессии являются не достоверными. Второй важный момент, группы с наличием и отсутствием амплификации гена не отличаются по активности пролиферации, определяемой на основании экспрессии гена Ki67 – стандартного маркера активности пролиферации.

Таблица 3.22 — Сравнение уровней экспрессии генов в группах с наличием и отсутствием амплификации гена Her2/neu, определяемой на основании метода FISH.

Наименование гена/значение	Среднее для Her2/neu -	Среднее для Her2/neu +	t-value	df	p
KI 67	112,02	107,0	0,14207	30	0,887975
STK15	178,06	371,3	-1,69602	30	0,100237
BIRC5	83,31	165,6	-2,01541	29	0,053213
CTSL2	16,08	37,1	-2,32125	30	0,027254
HER-2/new	28,10	58,4	-1,21596	30	0,233483
GRB7	813,60	4212,6	-2,30685	30	0,028147
ESR	409,56	132,7	1,84634	30	0,074730
PRG	4088,01	581,2	2,06461	30	0,047698
MGB1	50448,61	164622,8	-1,69258	30	0,100898

Следует отметить важный факт – низкий уровень экспрессии генов рецепторов эстрогенов и прогестерона (ESR, PGR). Сопоставление этих данных с результатами достоверно более высокой экспрессии генов BIRC5 и STK15-контролирующих процесс пролиферации позволяет высказать предположение, что амплификация Her2/neu компенсаторный механизм для сохранения высокого пролиферативного уровня в опухолях, с потерей гормональной зависимости пролиферации. Эти результаты согласуются с данными, указывающими на то, что Her2- позитивные опухоли имеют отличную от эстроген позитивных опухолей клиническую картину и для них должны использоваться другие схемы лечения.

3.2.5 Анализ экспрессии генов в ткани РМЖ в зависимости от степени злокачественности

При сравнительном анализе экспрессии генов в зависимости от степени злокачественности, определяемой морфологическим методом, было обнаружено, что в образцах G3 повышена экспрессия генов маркеров пролиферации STK15 и CCNB1, а также экспрессия катепсина CTSL2. Экспрессия C-erbB2 и его гомолога

GRB7 также была повышена в этой группе, а экспрессия ESR, PGR, и маммаглобина MGB1 была ниже в группе с более высокой степенью злокачественности (таблица 3.23).

Таблица 3.23 — Отличия экспрессии генов в образцах РМЖ зависимости от степени злокачественности опухоли G.

Ген	n G1	n G3	Среднее G1	Среднее G3	p
STK15	23	9	150,9	371,50	0,056505
CCNB1	23	9	34,6	55,51	0,062933
PRG	23	9	4347,9	951,11	0,068085
ESR	23	9	393,47	117,6	0,063471
C-erbB2	23	9	17,7	84,25	0,004652*
GRB7	23	9	577,8	4837,16	0,041629*
MGB1	23	9	187572,2	17533,47	0,013123*
CTSL2	23	9	16,0	37,13	0,020145*

Обнаружено, что повышение степени злокачественности сопровождается повышением пролиферативной и протеазной активности клетки. При этом экспрессия мРНК рецепторов эпидермального фактора роста C-erbB2 и его гомолога GRB7, опосредующих пролиферативные сигналы существенно выше при G3 стадии. Маркеры дифференцировки (ESR, PGR и MGB) снижены в образцах G3, что соответствует представлениям о снижении степени дифференцировки при прогрессии опухоли. На рисунках 3.5 и 3.6 показано изменение ряда проанализированных параметров от степени G.

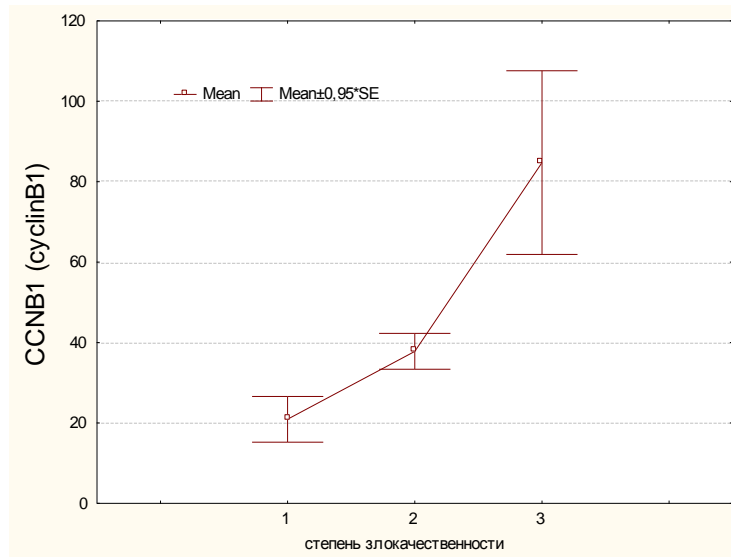


Рисунок 3.5 — Изменение экспрессии мРНК циклина В (CCNB1) в опухолях различной степени злокачественности (G1-G3).

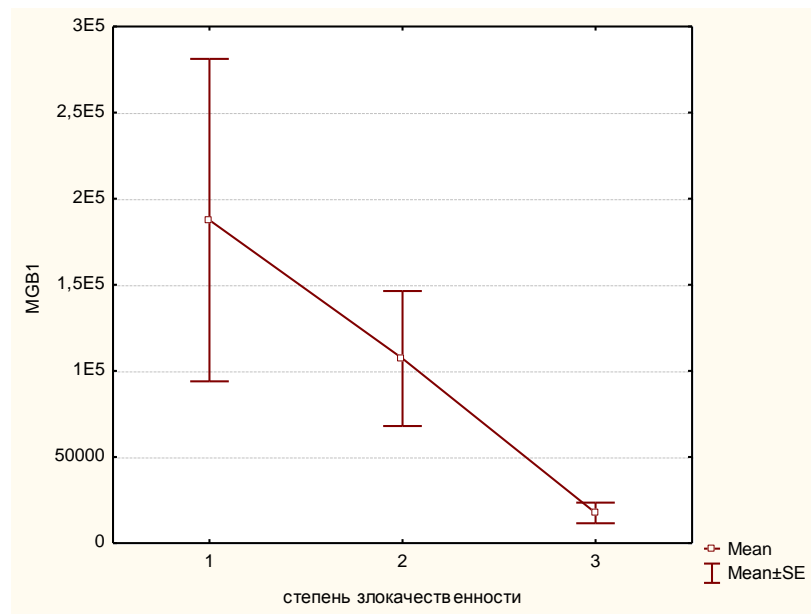


Рисунок 3.6 — Изменение экспрессии мРНК маммаглобина (MGB1) в опухолях различной степени злокачественности (G1-G3).

3.3 Проверка надежности полученных результатов на расширенной группе

Для проверки надежности полученных данных экспрессионного профиля и обоснования возможности использования для проведения анализа криообразцов, было выполнено сравнение уровней экспрессии для групп образцов с

выделением РНК из свежей ткани и образцов, подвергшихся криозаморозке в течение от 1 года до 4 лет.

Распределение криообразцов по типу ткани представлено в таблице 3.24.

Таблица 3.24 — Распределение криообразцов ткани молочной железы.

Тип ткани/N=309	ФА	РМЖ	Всего
норма	8	141	149
ФА	13	0	13
РМЖ	0	147	147
Всего	21	288	309

Распределение базы криообразцов по клинико-морфологическим признакам имело следующее распределение: распределение РМЖ по гистологическому типу – ИПР 80 образцов, ИДР 10 образцов, смешанный тип 2 образца, другие 4, без морфологического, но при наличии цитологического диагноза РМЖ – 51 образец.

Распределение криообразцов пациенток с РМЖ по размеру Т (классификация TNM) включало: 39 образцов – Т1; 84 образца – Т2; 7 образцов - Т3; 10 образцов - Т4.

Распределение криообразцов пациенток с РМЖ по наличию регионарных метастазов N (классификация TNM): N0 – 70 образцов; N1 – 37 образец; N2 – 27 образцов; N3 – 6 образцов; 7 образцов не имели данных.

Все пациентки данной группы не имели отдаленного метастазирования (M).

В таблицах 3.25 - 3.28 представлены результаты распределения образцов криобазы по показателям проведенных иммуногистохимических исследований.

Таблица 3.25 — Частота распределения ER +/-ER- опухолей в группе криообразцов.

ER	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
пол	54	54	36,73469	36,7347
отр	31	85	21,08844	57,8231
Пропущ.	62	147	42,17687	100,0000

Таблица 3.26 — Частота распределения ПР +/-ПР- опухолей в группе криообразцов.

ПР	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
пол	58	58	39,45578	39,4558
отр	26	84	17,68707	57,1429
Пропущ.	63	147	42,85714	100,0000

Таблица 3.27 — Частота распределения C-erbB2 опухолей в группе криообразцов.

C-erbB2	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
отр	24	24	16,32653	16,3265
1+	5	29	3,40136	19,7279
2+	24	53	16,32653	36,0544
3+	10	63	6,80272	42,8571
Пропущ.	83	147	56,46259	100,0000

Таблица 3.28 — Частота распределения Her2/neu +/- Her2/neu - опухолей в группе криообразцов, определенных методом Fish.

Her2/neu	Частота	Кумул.	Процент	Кумул.
отр	35	35	23,80952	23,8095
пол	15	50	10,20408	34,0136
Пропущ.	97	147	65,98639	100,0000

Общепринятыми методами статистической проверки похожести многомерных данных, каковыми являются полученные результаты по экспрессии в ткани молочной железы для двух независимых исследований, является метод сравнения корреляционных матриц. Проведенный анализ показал, что корреляционные матрицы для двух групп (коллекция 1 и коллекция 2) образцов имеют минимальные отличия и касаются тех же генов, отличия для которых получены при сравнении средних, а именно маммаглобина и гена рецептора погестерона. Остальные коэффициенты корреляции имеют одинаковую направленность (знак) в обеих группах данных (Приложение таблицы 1, 2).

Сравнение корреляционных матриц показывает высокую воспроизводимость наблюдаемых зависимостей изменения экспрессии генов в ткани опухоли для двух групп (коллекция 1 и коллекция 2).

Более подробное сравнение отличия экспрессии генов было проведено между группами в зависимости от типа ткани. При сравнении результатов полученных для образцов нормальной ткани и ткани РМЖ получено, что большинство направлений изменений экспрессии генов имели идентичный характер в обеих группах. Результаты достоверностей отличия средних значений представлены в таблице 3.29.

Таблица 3.29 — Достоверности отличия средних экспрессий генов в нормальной ткани и ткани РМЖ для коллекции 1 и коллекции 2.

Наименование гена	p (коллекция 1)	p (коллекция 2)
BAG1	0,298342	0,000000*
BAX	0,314655	
BCL2	0,005897*	0,000000*
BIRC5	0,000007*	0,000253*
CCNB1	0,000001*	0,000000*
CCND1		0,006681*
CD68		0,000002*
CTSL2	0,281643	0,188963
ESR1	0,001374*	0,000815*
GRB7	0,025921*	0,013859*
HER2	0,280606	0,034928*
KI67	0*	0,000000*
MGB1	0,011645*	0,811844
MMP11	0,000005*	0,000000*
MYBL2		0,000001*
MYC		0,000000*
NDRG1	0,000002*	0,000000*
P16INK4A		0,636582
PGR	0,014212*	0,599387
PTEN	0,000234*	0,000000*
STK15	0,000001*	0,000055*
TERT	0,192709	0,822203

*отличия достоверны

Обращает внимание, что наблюдается совпадение большинства достоверных отличий исследованных генов. При этом, увеличение количества проанализированных образцов привело к увеличению достоверности отличий для таких параметров как BAG1 и HER2. Однако отличия уровня экспрессии рецепторов прогестерона и маммаглобина в этой группе обследованных оказались не достоверны. Возможно, это связано с использованием отличающихся пар праймеров, или отличием устойчивости этих РНК к хранению и заморозке. Большая же часть исследованных генов имеет аналогичные, высоко достоверные отличия в опухолевой ткани, по сравнению с нормальной тканью.

Сравнение достоверности отличий в уровнях экспрессии в ткани опухоли РМЖ в ткани ФА представлено в таблице 3.30.

Таблица 3.30 — Достоверности отличия средних экспрессий генов в ткани ФА и ткани РМЖ для коллекции 1 и коллекции 2.

Наименование гена	p (коллекция 1)	p (коллекция 2)
BIRC5	0,043*	0,0496*
CCNB1	0,058*	0,0064*
ESR1	0,543	0,0423*
KI67	0,005*	0,0048*
MMP11	0,045*	0,071
MYBL2	-	0,0179*
NDRG	0,014*	0,138802
PGR	0,584	1E-06*
PTEN	0,071	0,0716
STK15	0,045*	0,0235*
MGB1	0,026849*	0,0587*

Сравнение отличий в двух морфологических группах инфильтративного долькового и протокового РМЖ показало, что полученные результаты имеют высокую степень сходимости. Обе морфологические формы в обеих группах пациентов ($n_1 = 68$ и $n_2 = 147$) практически не отличались по экспрессии генов. Отличие обнаружено только для одного гена – PTEN, экспрессия которого была достоверно выше в группе 2. Кроме того, отличия экспрессии циклина В, имевшие только тенденцию в первой группе ($p=0,09$) во второй группе получили

подтверждение и стало достоверным ($p=0,04$). Это соответствует правилам статистике, когда увеличение количества наблюдений приводит к увеличению достоверности наблюдаемых изменений.

Для сравнения полученных результатов в двух группах образцов мы также провели оценку направленности изменений при сравнении уровней экспрессии в различных подгруппах выборки. В таблице 3.31 приводится сравнение направлений (возрастает/убывает) и степени отличия (процент) изменения уровня экспрессии в группах прогестерон положительных и прогестерон отрицательных опухолей РМЖ, в последней колонке указано, совпадают полученные отличия в двух группах или нет.

Таблица 3.31 – Сравнение изменений уровня экспрессии в группах прогестерон положительных и прогестерон отрицательных опухолей РМЖ для коллекций 1 и 2.

Наименование гена	Степени отличия (коллекция 1)	Степени отличия (коллекция 2)	
BAG1	32	16,2	да
BCL2	18	23,8	да
BIRC5	-33	-60,3	да
CCNB1	-3	-24,8	да
CTSL2	-125	-303,5	да
ESR1	52	76,1	да
GRB7	35	-639,2	нет
HER2	30	-311,8	нет
KI67	-42	-25,3	да
MGB1	48	-28,1	нет
MMP11	59	22,5	да
NDRG1	-33	-42,7	да
PGR	74	84,8	да
PTEN	-6	-2,6	да
STK15	-17	-70,6	да
TERT	-187	-363,8	да

Приведенные результаты показывают, что только 3 гена (GRB7, HER2, MGB1) отличаются по полученным зависимостям, т.е. более 80% зависимостей,

обнаруженных в первой коллекции образцов, воспроизводятся при анализе второй коллекции.

Эти результаты позволят сделать вывод, что обнаруженные зависимости изменения экспрессии генов, а также разработанные на основании этих зависимостей диагностические алгоритмы должны обладать высокой надежностью.

3.4 Взаимосвязь экспрессии мРНК маммаглобина с клинико-морфологическими особенностями патологии молочных желез

Экспрессия тканеспецифических маркеров часто меняется в процессе опухолевой трансформации. Был исследован уровень экспрессии мРНК маммаглобина при различных патологических процессах в ткани молочной железы. Маммаглобин представляет особый интерес, как один из не многих тканеспецифических маркеров молочной железы. В тоже время, в литературе данных, описывающих изменение его экспрессии при различных патологиях МЖ недостаточно.

3.4.1 Исследование экспрессии мРНК маммаглобина в образцах тканей молочной железы

В этот раздел нашей работы были включены 42 пациентки с доброкачественными новообразованиями молочной железы, 69 больных раком молочной железы (РМЖ) I-IV стадии и 99 образцов нормальной ткани молочной железы. Всего было проанализировано 210 образцов.

В группу с доброкачественными новообразованиями молочных желез вошли пациентки в возрасте от 19 до 59 лет, средний возраст составил $33 \pm 10,00$ года.

Проведен сравнительный анализ уровня экспрессии мРНК маммаглобина в неизменной ткани молочной железы, в ткани фиброаденомы и ткани РМЖ. Результаты представлены в таблице 3.32.

Таблица 3.32 — Средний уровень экспрессии мРНК в нормальной ткани молочной железы и при различной её патологии.

	Количество наблюдений	Среднее значение, отн.ед	Стандартная ошибка
Нормальная ткань	99	59,6	25,2
Фиброаденома	41	80,6	9,41
РМЖ	69	161,0	40,9

Показано, что средний уровень экспрессии мРНК маммаглобина в неизменной ткани молочной железы равен 59,6 отн.ед, в то время как при фиброаденоме молочной железе уровень экспрессии мРНК увеличен и равен 80,6 отн.ед, а при раке молочной железы средний уровень повышается до 161,0 отн.ед. Различия между группами являются достоверными: для групп «норма - РМЖ» ($p=0,0057$), при анализе групп «фиброаденома -РМЖ» достоверность составила - $p=0,061$, только в группе «норма-фиброаденома» достоверность ставила – $p=0,13$.

Проанализирована зависимость уровня экспрессии мРНК маммаглобина от гистологического строения опухолевого образования. Для анализа взаимосвязи экспрессии мРНК маммаглобина с гистологическим строением РМЖ все пациентки были разделены на 4 группы (таблица 3.33). Среди которых - 44(63,78%) составили образцы инфильтративного протокового рака, 13 (18,84%) образцы инфильтративного долькового рака, 4(5,80%) образцы слизистого и 8(11,58%) образцов прочих форм рака. Наиболее высокие уровни экспрессии мРНК маммаглобина наблюдались при слизистом типе злокачественного новообразования (497,6 отн.ед) РМЖ. Однако достоверных различий между уровнем экспрессии мРНК маммаглобина между наиболее часто встречающимися формами РМЖ не получено (рисунок 3.7).

Таблица 3.33 — Сравнение уровня экспрессии мРНК маммаглобина при раке молочной железы различного гистологического строения. (ИД-инфильтративно-дольковый рак, ИП - инфильтративно-протоковый рак).

	Среднее значение, MGB1/HPRT, отн.ед	Стандарт. ошибка	Достоверность отличия с ИД, р	Достоверность отличия с ИП, р	Достоверность отличия с прочими формами рака, р
ИД	73,8	93,1	-	-	-
ИП	161,5	50,6	0,41	-	-
Прочие формы	133,9	118,7	0,69	0,83	-
Слизистый рак	492,6	167,9	0,32	0,06	0,08

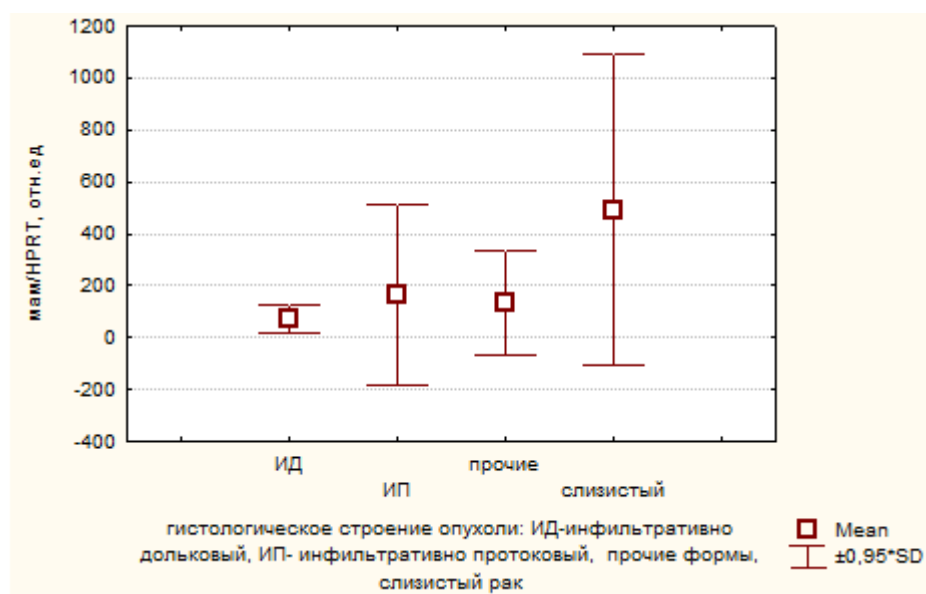


Рисунок 3.7 — Зависимость экспрессии мРНК маммаглобина от гистологического строения рака молочной железы (по оси ординат – уровень экспрессии мРНК МГА относительно мРНК HPRT1).

Для фибroadеномы молочной железы был так же проведен анализ зависимости экспрессии мРНК маммаглобина от ее гистологической формы. Результаты представлены на рисунке 3.8 и таблице 3.34.

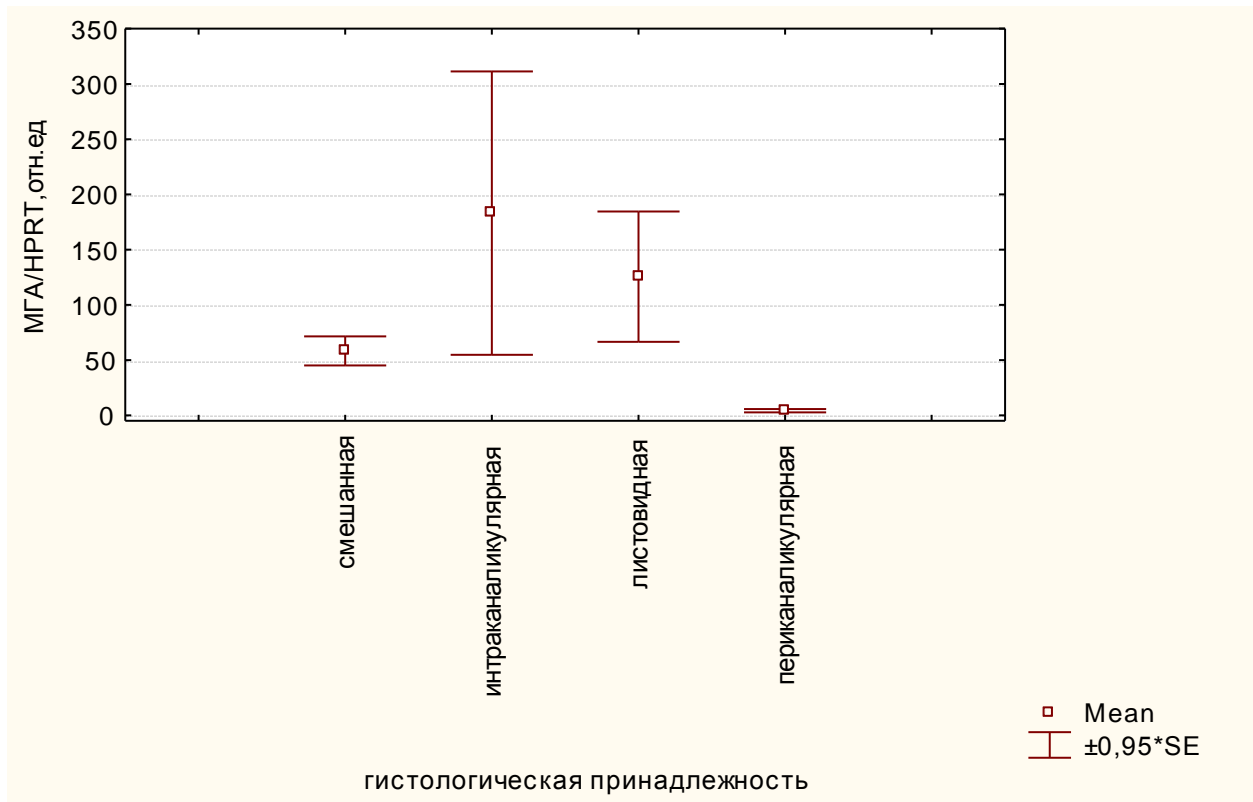


Рисунок 3.8 — Зависимость экспрессии мРНК маммаглобина от гистологического строения фибroadеномы молочной железы (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК «МГА» относительно мРНК HPRT1).

Из 41 образца фибroadеномы 28(68,30%) образцов составляли фибroadеномы смешанного строения, 7(17,08%) образцов фибroadеномы интраканаликулярного строения, 3 (7,31%) образца филоидной опухоли и 3 (7,31%) образца фибroadеномы периканаликулярного строения. Из приведенных в таблице данных видно, что достоверных отличий между уровнем экспрессии мРНК маммаглобина и гистологической принадлежности фибroadеномы не получено (таблица 3.34).

Таблица 3.34 — Сравнение уровня экспрессии мРНК маммаглобина при фиброаденоме молочной железы различного гистологического строения.

	Среднее значение	Стандартная ошибка	Достоверность отличия со смешанной фиброаденомой, р	Достоверность отличия со интракрана-ликулярной фиброаденомой, р	Достоверность отличия с листовидной фиброаденомой, р	Достоверность отличия с перикана-ликулярной фиброаденомой, р
Смешанная фиброаденома	58,3	30,01	-	-	-	-
Интракрана-ликулярная фиброаденома	183,0	60,03	0,07	-	-	-
Филоидная опухоль	125,5	91,70	0,49	0,60	-	-
Перикана-ликулярная фиброаденома	4,16	91,70	0,57	0,11	0,12	-

Также была проведена оценка зависимости уровня экспрессии мРНК маммаглобина от стадии заболевания (Т,N) при РМЖ (рисунок 3.9).

Сравнивая уровень экспрессии мРНК маммаглобина и размер опухоли (Т) достоверные различия были выявлены для групп Т2-Т4 ($p=0,013$). Среднее значение для группы Т2- 72,61, для группы Т4- 313,51. Стоит отметить, что эти группы самые многочисленны. В группу Т2 – вошли 28(40,57%) пациенток, а в группу Т4- 13(18,84%) пациенток. Также отличимые по среднему значению результаты обнаружены между группами Т3-Т4 (49,01 отн.ед и 313,51 отн.ед соответственно), но, отличия между результатами не достоверны ($p=0,32$) вероятно из-за маленького числа наблюдений в группе Т3 (3 пациентки).

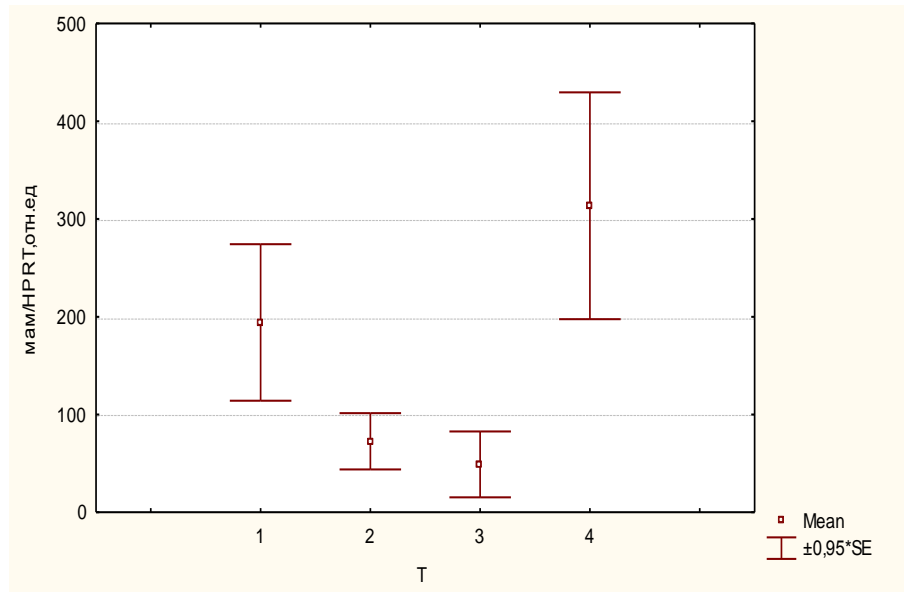


Рисунок 3.9 — Зависимость экспрессии мРНК маммаглобина и показателя Т (размера опухоли) по классификации TNM (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК маммаглобина относительно уровня экспрессии гена HPRT1).

Обнаружено, что уровень экспрессии мРНК маммаглобина снижается при увеличении размера опухоли для значений области T1-T3 (по классификации TNM). Значения показателя уровня экспрессии MGB1 для группы с размером опухоли T4 не являлись достоверными из-за малого количества пациентов этой группы.

Также был проведен анализ зависимости уровня экспрессии мРНК маммаглобина в ткани опухоли и степени метастазирования опухоли в лимфатические узлы (N по классификации TNM) (рисунок 3.10).

В группу вошла 41 (59,42%) пациентка без метастазов в лимфатические узлы и 28 (40,58%) пациенток с метастазами в лимфатические узлы (N1-N3). Из представленных данных видна тенденция снижения уровня экспрессии мРНК маммаглобина при увеличении числа пораженных лимфоузлов.

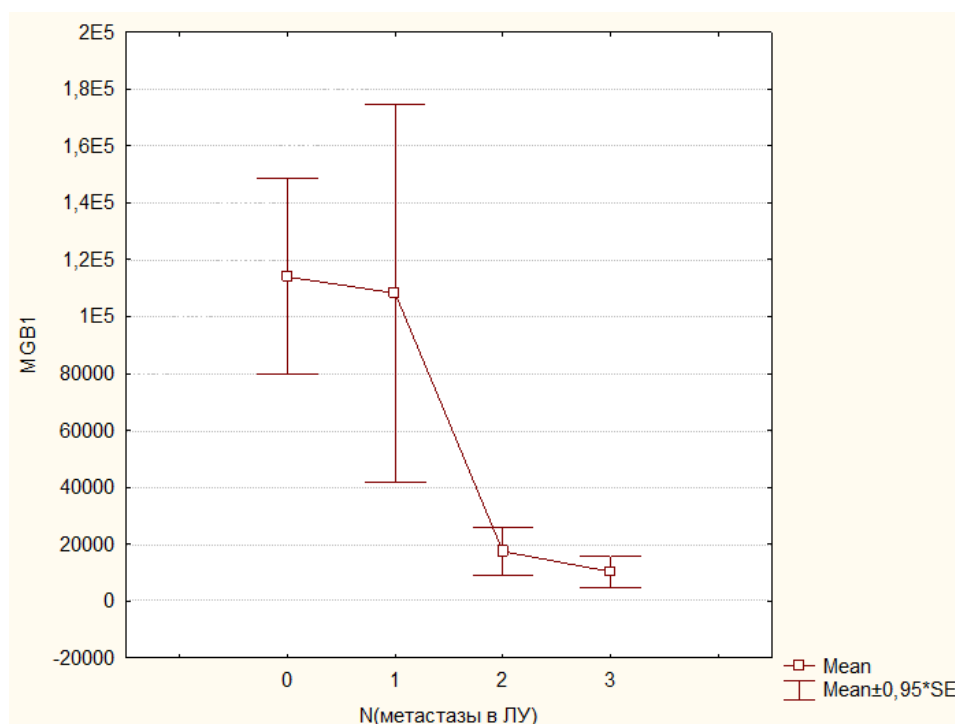


Рисунок 3.10 — Зависимость уровня экспрессии мРНК маммаглобина от поражения лимфатических узлов (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК МГА относительно мРНК HPRT1).

Так, если метастазы в лимфоузлах не обнаружены ($N=0$), среднее значение экспрессии мРНК маммаглобина в опухоли составляет 193,50 отн. Ед, в то время, как при поражении одного лимфоузла ($N1$), среднее значение маммаглобина составляет 167,56, а при поражении нескольких лимфоузлов ($N2$) среднее значение уровня экспрессии маммаглобина снижается до 66,42 отн.ед.. При наличии метастазов во всех удаленных во время операции лимфоузлах ($N3$) – среднее значение маммаглобина равно 16,63 отн.ед., т.е чем больше метастазов в региональных лимфоузлах, тем меньше уровень экспрессии мРНК маммаглобина в первичной опухоли – источника этих метастазов. При статистической обработке результатов достоверных различий между группами выявлено не было ($p_{N0/N1}=0,25$; $p_{N1/N2}=0,35$; $p_{N2/N3}=0,38$), однако имеется четко выраженная тенденция снижения уровня экспрессии мРНК маммаглобина при увеличении N . Проведенный анализ с использованием метода линейной регрессии показал

наличие достоверной связи уровня экспрессии мРНК MGB1 при переходе от стадии N1 к N2.

Анализ зависимости уровня экспрессии мРНК маммаглобина в ткани опухоли от степени злокачественности (G) опухоли представлен на рисунке 3.11.

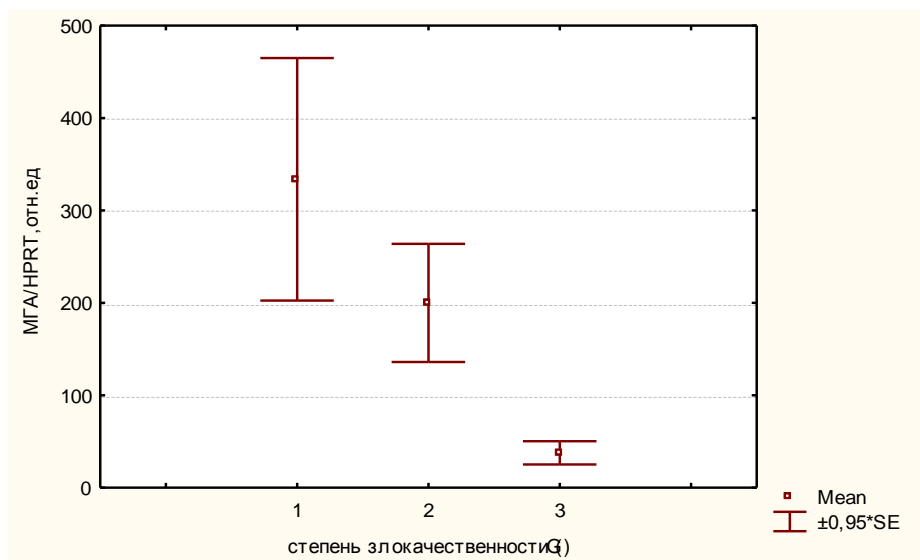


Рисунок 3.11 — Зависимость уровня экспрессии мРНК маммаглобина от степени злокачественности (G) опухоли (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК MGA относительно мРНК HPRT1).

При анализе связи уровня экспрессии мРНК маммаглобина в ткани опухоли и степени ее злокачественности были обнаружены достоверные различия (рисунок 3.11) между группами G1 (низкая степень злокачественности) и G3 (высокая степень злокачественности) ($p=0,0019$), так же как и между группами G2 (умеренная степень злокачественности) и G3 ($p=0,059$). Достоверных различий между G1 и G2 степенями злокачественности обнаружено не было ($p=0,40$). При этом обнаружено, что чем выше степень злокачественности (ниже степень дифференцировки клеток) тем меньше уровень экспрессии мРНК маммаглобина. Так при G1- уровень экспрессии мРНК маммаглобина - 333,78 отн.ед, при G2- 204,45 отн.ед, при G3 – 38,48 отн.ед.

Проведенный анализ показал связь уровня экспрессии мРНК маммаглобина с уровнем экспрессии рецепторов эстрогенов и прогестерона в ткани опухоли. На

рисунке 3.12 представлена зависимость уровня экспрессии мРНК маммаглобина от уровня экспрессии рецепторов эстрогена (метод иммуногистохимии).

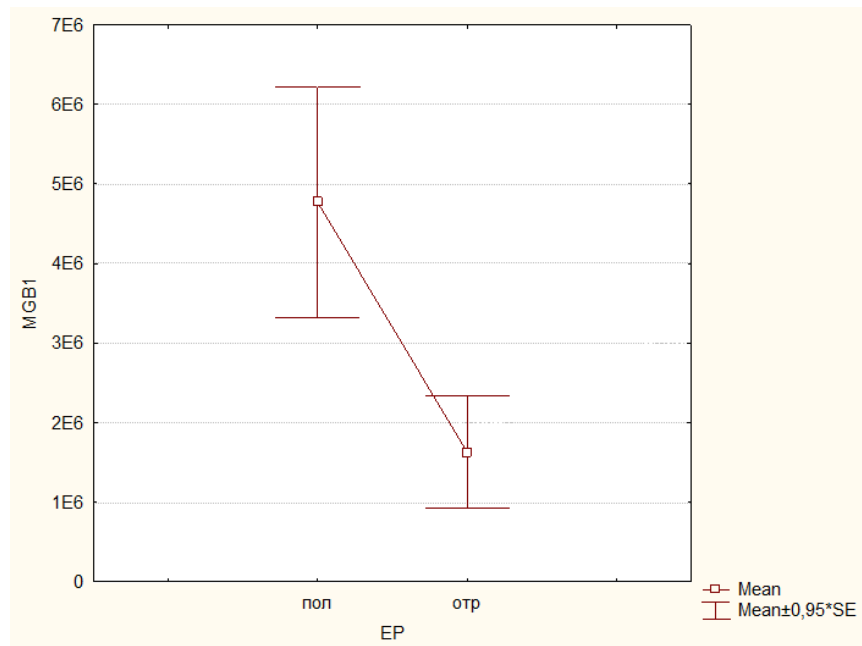


Рисунок 3.12 — Зависимость уровня экспрессии мРНК маммаглобина от уровня экспрессии рецепторов эстрогена (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК МГА относительно мРНК HPRT1).

Среднее значение экспрессии мРНК маммаглобина при отсутствии экспрессии рецепторов эстрогенов составило 30,00 отн.ед, при наличии экспрессии рецепторов эстрогенов уровень экспрессии мРНК маммаглобина равно 62,82 отн.ед. Абсолютные значения экспрессии мРНК маммаглобина отличаются более чем в два раза. Низкое значение экспрессии MGB1 в EP-опухолях обусловлено снижением экспрессии тканеспецифических рецепторов характерным для процесса прогрессии опухоли.

При исследовании зависимости уровня экспрессии мРНК маммаглобина от уровня экспрессии прогестероновых рецепторов получено резкое снижение уровня MGB1 в ПР-опухолях (рисунок 3.13).

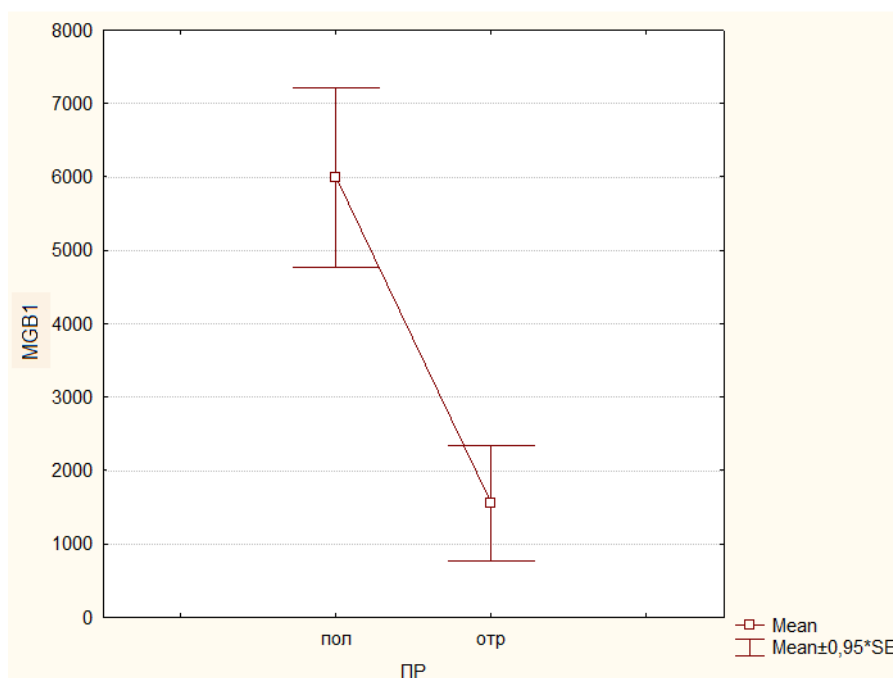


Рисунок 3.13 — Зависимость уровня экспрессии мРНК маммаглобина от уровня экспрессии рецепторов прогестерона (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК MGB1 относительно мРНК HPRT1).

Анализ связи уровня экспрессии мРНК маммаглобина и рецептора c-erbB2, определяемого методом иммуногистохимии, представлен на рисунке 3.14.

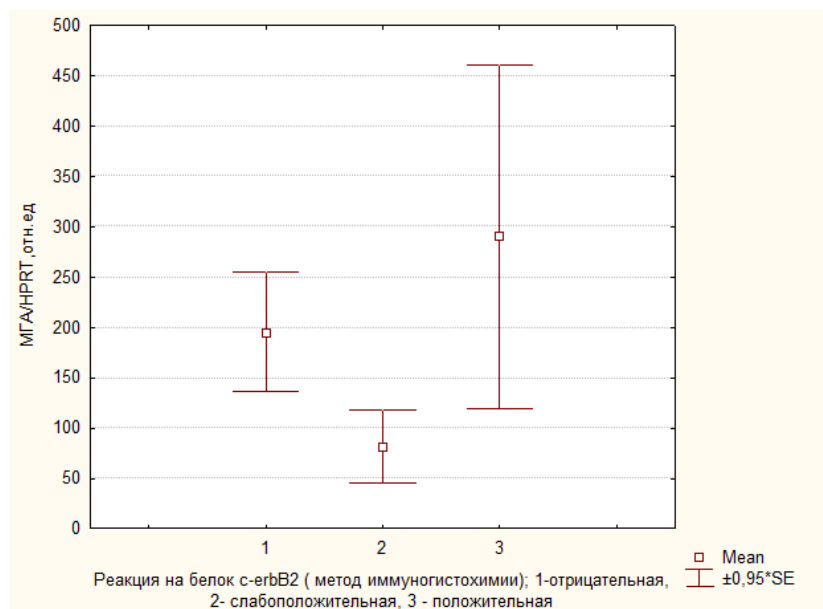


Рисунок 3.14 — Зависимость уровня экспрессии мРНК маммаглобина в ткани опухоли от уровня экспрессии c-erbB2 (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК MGB1 относительно мРНК HPRT1).

При исследовании образцов ткани опухоли молочной железы методом иммуногистохимии в 30 случаях (43,47%) реакция на белок c-erbB2 обнаружена не была, при этом, среднее значение экспрессии мРНК маммаглобина составило 195,25 отн.ед, слабоположительная реакция была обнаружена в 28 (42,02%) случаях, среднее значение маммаглобина составило при этом 81,11 отн.ед, положительная реакция на рецептор c-erbB2 была обнаружена в 10 образцах(14,51%) и в этой группе образцов средний уровень экспрессии мРНК маммаглобина был равен 290,16 отн.ед. Достоверность отличия между группами составила - $p(1-2)-0,13$; $p(2-3)-0,10$.

При слабоположительной или положительной реакции на рецептор c-erbB2 как правило проводят исследование на наличие или отсутствие амплификации гена Her-2/neu в опухолевой ткани. Амплификация гена Her-2/neu методом FISH гибридизации была исследована у 34 женщин с диагнозом рак молочной железы. У 28 (73,68%) пациенток амплификации гена Her-2/neu не было обнаружено. Среднее значение уровня экспрессии мРНК маммаглобина в этой группе составило – 51,98 отн.ед. У 10 (26,32%) пациенток была обнаружена амплификация гена Her-2/neu, и уровень экспрессии мРНК маммаглобина в этой группе составил 346,92 отн.ед. Отличия в группах достоверны ($p-0,017$) (рисунок 3.15).

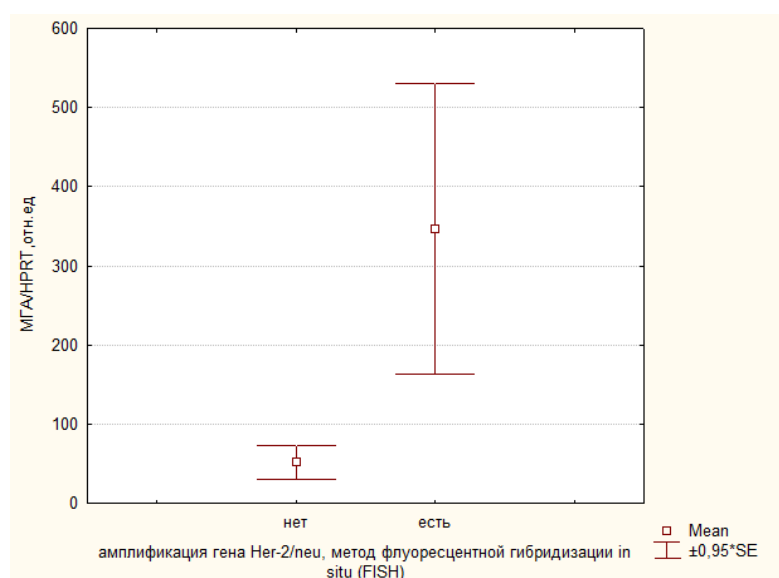


Рисунок 3.15 — Зависимость уровня экспрессии мРНК маммаглобина от амплификации гена Her-2/neu (метод флуоресцентной гибридизации in situ)

(FISH)) (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК MGB1 относительно мРНК HPRT1).

Также было оценено влияние предоперационной химиотерапии на уровень экспрессии мРНК маммаглобина. Результаты представлены на рисунке 3.16.

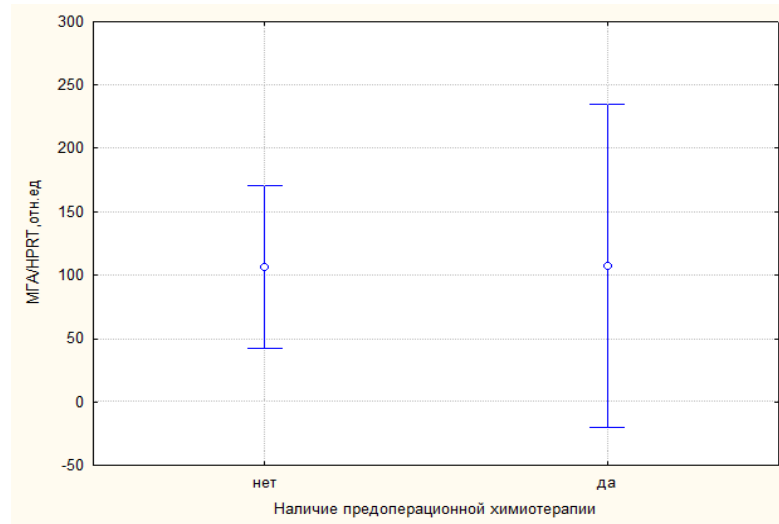


Рисунок 3.16 — Зависимость экспрессии мРНК маммаглобина от наличия или отсутствия предоперационной химиотерапии (По оси ординат – уровень экспрессии мРНК MGB1 относительно мРНК HPRT1).

Проведенное сравнение показало, что достоверных отличий между группами не обнаружено ($p=0,83$). Т.е. проведение неоадьювантной химиотерапии достоверно не изменяет уровень экспрессии мРНК маммаглобина в ткани опухоли.

Таким образом, анализ зависимости уровня экспрессии мРНК маммаглобина и таких характеристик опухоли как ее размер (показатель T по классификации TNM), активность метастазирования в регионарные лимфоузлы (показатель N, по классификации TNM) и степени злокачественности, оцениваемой на основании гистологической картины ткани опухоли, показал, что увеличение стадии и степени злокачественности коррелирует со снижением уровня экспрессии мРНК маммаглобина. Это, по-видимому можно связать со снижением степени дифференцировки ткани РМЖ при увеличении стадии и степени злокачественности и потери тканеспецифических признаков.

3.4.2 Исследование экспрессии мРНК маммаглобина в крови

Возможность диагностики опухолевого процесса на ранней стадии заболевания принципиально важна для повышения эффективности его лечения. Для решения данной задачи интерес представляет поиск ткане- и опухоль-специфических маркеров в периферической крови. Проведенный анализ уровня экспрессии мРНК маммаглобина в ткани опухоли показал, что увеличение его экспрессии характерно для ранних стадий рака, что представляет интерес именно с точки зрения обнаружения его в периферической крови как диагностического маркера при РМЖ. Поэтому было проведено сравнение возможности обнаружения мРНК маммаглобина в крови у здоровых доноров, в группе пациентов с диагнозом РМЖ, при фиброаденоме молочной железы и при опухолях локализующихся в других органах. Результаты обнаружения мРНК маммаглобина в крови у различных групп пациентов представлены в таблице 3.35.

Таблица 3.35 — Частота обнаружения мРНК маммаглобина методом «Nested» ПЦР в периферической крови у различных групп пациентов.

		Количество наблюдений	Положительный результат	Процент положит. случаев.
Рак молочной железы		95	58	61%
Доброкачественные образования молочной железы	Фиброзно-кистозная мастопатия	4	1	25%
	Фиброаденома	16	4	25%
	Фибросклероз	2	0	0
Опухоль другой локализации	Опухоли ЖКТ	8	0	0
	Опухоли органов дыхания	5	1	20%
	Рак почки	1	0	0
	Рак предстательной железы	2	0	0
	Рак матки, эндометрия	12	0	0
Здоровые доноры		24	0	0

В отличие от анализа, проведенного в ткани опухоли, фиброаденомы и нормальной ткани молочной железы исследование экспрессии мРНК маммаглобина в периферической крови осуществлялось методом «nested» ПЦР. Это было связано с тем, что стандартный метод количественного ПЦР, как правило, не обнаруживал мРНК маммаглобина в периферической крови. (плазме крови). Метод «nested» ПЦР обладает гораздо более высокой чувствительностью, однако данный метод не является количественным, т.е. при его использовании можно определить наличие или отсутствие мРНК маммаглобина в том или ином образце по принципу «да»-«нет».

Проведенные исследования по обнаружению мРНК маммаглобина в периферической крови показали, что в группе больных РМЖ мРНК маммаглобина обнаруживается в 61 % всех исследованных случаев.

У пациенток с доброкачественными образованиями молочной железы экспрессия мРНК маммаглобина была обнаружена в 22,7% случаев. В образцах крови пациентов с другой локализацией опухолевого процесса мРНК маммаглобина была обнаружена лишь в одном случае (у пациентки больной раком легкого). Среди образцов крови здоровых доноров мРНК маммаглобина не была обнаружена ни в одном случае. Таким образом, мРНК маммаглобина обнаруживается преимущественно при патологии молочной железы и не обнаруживается при других злокачественных новообразованиях.

Результаты исследования частоты обнаружения мРНК маммаглобина в крови в зависимости от размера опухоли молочной железы (Т по классификации TNM) представлены на рисунке 3.17.

Из представленных данных видно, что процент обнаружения мРНК маммаглобина в крови уменьшается с увеличением размера опухолевого узла. Так, мРНК маммаглобина в периферической крови была выявляется в 33,3-69,4% случаев, и зависит от размера опухолевого узла, с увеличением размера опухоли процент выявляемых мРНК маммаглобина случаев снижается.

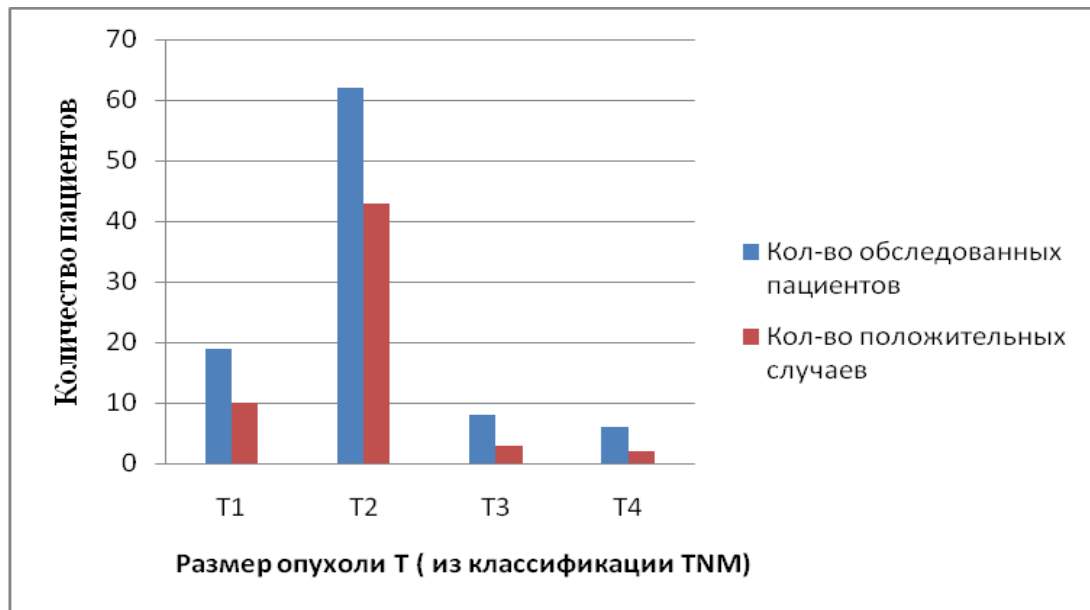


Рисунок 3.17 — Распределение пациентов по параметру Т (по классификации TNM) и количество пациентов с наличием мРНК маммаглобина в крови.

Анализ зависимости частоты выявляемости маммаглобина с метастатическим поражением лимфоузлов показал, что при отсутствии поражения лимфоузлов процент выявляемости мРНК маммаглобина равен 53,3%. При единичном поражении лимфоузлов процент выявляемости мРНК маммаглобина составил 75,0%, а при поражении нескольких лимфоузлов (N2) - 60%.

Приведенные результаты позволяют определить чувствительность и специфичность метода обнаружения мРНК маммаглобина в периферической крови для диагностики РМЖ. Чувствительность метода составила 61%, а специфичность – 92%. Для сравнения, сывороточный онкомаркер СА15-3 используемый как маркер рака молочной железы в настоящее время имеет чувствительность для ранних стадий РМЖ - 14,0%, а специфичность 92,3%. Прогностическая ценность положительного результата 66,7%. Таким образом, предложенный метод более информативен, чем используемый в настоящее время в клинической практике.

3.5 Сравнительная оценка моделей определения фенотипа опухоли с использованием расширенной панели экспрессии генов и панели классических маркеров, определяемых методом ИГХ при РМЖ

Определение молекулярного фенотипа рака молочной железы имеет большое клиническое значение, т.к. необходимо для правильного формирования программы лечения. Использование классических маркеров (KI67, рецепторы эстрогена, прогестерона, HER2/neu) не является достаточным для прецизионного фенотипирования опухоли (Guiu1,S. , 2012, Park S., 2011). Расширение и оптимизация панели маркеров для получения клинически значимых результатов дает возможность более точной оценки фенотипа РМЖ. (Reis-Filho J.S, 2011). Проведенное исследование включало проведение сравнительной оценки моделей определения фенотипа опухоли методом ПЦР в реальном времени с использованием расширенной панели из 24 генов (контроль пролиферации: KI67, STK15, CCNB1, CCND, MYC, MIBL2, P16ink4A, PTEN; контроль апоптоза: BIRC5, BCL2, BAG, TERT, NDRG1; дифференцировка/рецепторы: ESR1, PGR, HER2/neu, GRB7, MGB1; межклеточные взаимодействия: MMP11, CTSL2 CD68) и генов, кодирующих классические иммуногистохимические маркеры (KI67, ESR1, PGR и HER2/neu) и 3-х референсных генов в 359 образцах парафинизированной ткани РМЖ. Для 216 больных РМЖ I-II стадии была получены данные о 10-летней безрецидивной выживаемости и выполнена сравнительная ее оценка в фенотипических группах.

Была проанализирована возможность фенотипирования ткани РМЖ на основании индивидуальной оценки уровня экспрессии мРНК 24 генов, включенных в эти процессы. Одной из целей исследования было определить, насколько выбранные нами гены отражают известные феноменологические особенности фенотипов РМЖ. Другой целью было выяснить, какую дополнительную информацию об индивидуальном фенотипе может дать использование расширенной панели маркеров (24 генов) по сравнению с классическими маркерами: KI67, рецепторами эстрогена/прогестерона, HER2/neu, анализируемыми методом ИГХ.

Для анализа мРНК в парафиновых блоках образцов ткани молочной железы были оптимизированы ПЦР наборы (совместно с сотрудниками фирмы ЗАО ДНК Технология) и оптимизирована методика депарафинизации (подробно методика изложена в разделе «Материалы и методы»).

В исследование были включены образцы блоков парафинизированной ткани РМЖ, полученные от 325 больных. Все больные получали лечение в ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» в период с 2001 по 2009 год. Критериями включения в исследование были размер опухоли до 5 см, не более 3 метастатических лимфоузлов или их отсутствие по данным патоморфологического исследования, отсутствие неоадьювантной полихимиотерапии. Медиана наблюдения составила 93 [72,8 – 119,4 (25-75 процентиля)] месяца, прогрессирование отмечено в 109 (30,5%) случаях. Средний возраст больных в группе прогрессирования составил $53,4 \pm 12$ лет, в группе без прогрессирования $57,2 \pm 9,3$ года ($p=0,27$). В таблице представлены основные клиничко-морфологические характеристики для исследованных пациентов (таблица 3.36).

Таблица 3.36 — Основные клиничко-морфологические характеристики исследуемых пациентов

Характеристика	Прогрессирование (%)	Без прогрессирования (%)	p
Размер опухоли			
T1 (<2 см)	48%	43%	0,56
T2 (2,0-4,9 см)	52%	56%	0,62
Метастазы в ЛУ			
N0	43%	52%	0,31
N1 (1-3 мтс л/у)	57%	48%	0,27
Степень дифференцировки			
1-2	72%	64%	0,23
3	28%	36%	0,44

Анализ данных показывает, проанализированные группы пациентов были сбалансированы по клинико-морфологическим характеристикам.

3.5.1 Модель фенотипирования РМЖ на основе анализа профиля экспрессии генов

Анализ результатов регрессионной модели Кокса для T, N, и уровней экспрессии всех исследованных генов в ткани РМЖ показал, что независимыми факторами прогноза являются, кроме T, N также экспрессия таких генов как: STK15, Muc, MYBL2, BIRC5, Her2, MGB (таблица 3.37)

Таблица 3.37 — Вклад морфологических и молекулярных характеристик опухоли в безрецидивную выживаемость.

Прогресс $\chi^2 = 90,8406$ $сс = 23$ $p = ,00000$						
	Бета	Станд.	t-знач.	Экспон.	Вальда	p
T	0,795424	0,169622	4,68939	2,215380	21,99038	0,000003*
N	0,459054	0,125662	3,65308	1,582577	13,34497	0,000260*
lnKI67	-0,003559	0,121373	-0,02932	0,996447	0,00086	0,976607
lnSTK15	0,345446	0,101902	3,38998	1,412619	11,49194	0,000700*
lnCCNB1	0,088421	0,159919	0,55291	1,092448	0,30571	0,580329
lnCCND1	0,052655	0,121220	0,43437	1,054066	0,18868	0,664021
lnMYC	-0,345773	0,128180	-2,69756	0,707673	7,27685	0,006989*
lnMYBL2	0,278853	0,127174	2,19269	1,321614	4,80788	0,028337*
lnP16INK4a	0,017649	0,084750	0,20825	1,017805	0,04337	0,835039
lnPTEN	-0,069054	0,165084	-0,41829	0,933277	0,17497	0,675736
lnBIRC5	-0,335758	0,081659	-4,11173	0,714796	16,90630	0,000039*
lnBCL2	-0,036476	0,103310	-0,35308	0,964181	0,12466	0,724034
lnBAG1	-0,104465	0,144577	-0,72256	0,900806	0,52209	0,469956
lnTERT	0,060622	0,046780	1,29590	1,062497	1,67936	0,195019
lnNDRG1	0,040728	0,056224	0,72439	1,041569	0,52475	0,468829
lnESR1	0,093698	0,081428	1,15068	1,098228	1,32406	0,249873
lnPGR	-0,004998	0,073588	-0,06792	0,995014	0,00461	0,945846
lnHER2	-0,212253	0,104120	-2,03855	0,808760	4,15567	0,041503*
lnGRB7	0,088343	0,072783	1,21378	1,092363	1,47327	0,224840
lnMGB1	0,061965	0,036405	1,70212	1,063926	2,89721	0,088743*
lnMMP11	0,007652	0,053328	0,14348	1,007681	0,02059	0,885913
lnCTSL2	0,165651	0,108285	1,52977	1,180162	2,34021	0,126083
lnCD68	0,110035	0,159863	0,68831	1,116317	0,47377	0,491264

Далее был использован метод классификации K-средних, при котором выбрано 5 групп, как и количество групп, выделяемых соглашением, принятом с Сент-Гален. Полученные результаты классификации для каждого образца использовали как вновь полученную характеристику ткани опухоли конкретного пациента (таблица 3.38).

Таблица 3.38 — Классификация образцов ткани РМЖ методом K-средних на основании уровня экспрессии комплекса исследованных генов. Приведены центры кластеров для 5 групп (отн. ед.).

	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
No. 1	0,000000	6,845702	2,246846	2,433626	1,567651
No. 2	2,616429	0,000000	3,933752	2,757710	3,974505
No. 3	1,498948	1,983369	0,000000	1,633634	2,011993
No. 4	1,560008	1,660636	1,278137	0,000000	1,276610
No. 5	1,252059	1,993616	1,418447	1,129871	0,000000

На основании проведенной классификации по методу k-средних для каждой из этих групп было посчитано среднее значение уровня экспрессии всех анализируемых генов (таблица 3.39).

Таблица 3.39 — Значения средних для всех генов для сформированных 5 групп

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5
lnKI67	5,18931	6,199980	4,15923	5,571619	5,45973
lnSTK15	3,73334	4,283129	2,02906	3,629158	3,45582
lnCCNB1	3,30268	3,554960	2,52837	3,117938	3,13764
lnCCND1	3,09227	1,946065	2,53625	3,306490	2,69390
lnMYC	3,37313	2,756703	2,63805	2,189634	2,55858
lnMYBL2	3,46231	4,339052	2,35531	3,163038	3,17937

Продолжение таблицы 3.39

lnP16INK4a	4,30840	4,742893	3,52691	3,356697	3,72065
lnPTEN	3,69522	3,137597	3,64459	3,629781	3,59410
lnBIRC5	2,44846	4,316436	1,58707	3,806532	3,20009
lnBCL2	4,28376	1,767280	2,74684	3,860606	3,21949
lnBAG1	2,78535	1,537214	1,98554	2,163040	2,04012
lnTERT	0,37763	4,614591	0,41185	3,254902	4,95729
lnNDRG1	0,65811	1,312801	0,48590	2,759476	1,27987
lnESR1	7,09619	2,887867	6,10871	7,002741	6,28167
lnPGR	5,88460	1,945728	5,16391	5,346429	5,21567
lnHER2	5,26318	3,212255	3,43344	3,613963	4,42622
lnGRB7	7,48263	5,775735	5,78319	5,455424	6,80693
lnMGB1	13,70404	6,281093	10,36219	8,991008	13,10637
lnMMP11	10,23467	6,527136	6,13018	8,446616	8,02254
lnCTSL2	4,21986	4,891603	3,60750	3,345500	3,64077
lnCD68	4,04345	4,134795	3,85553	4,291647	4,17942

Для проверки устойчивости классификации на сформированные 5 групп методом К-средних на основании уровня экспрессии 24 генов были проведены вычисления с помощью дискриминантного анализа. При этом, использовался идентификатор принадлежности к группам, полученный после использования метода К-средних (таблица 3.40).

Таблица 3.40 — Результаты дискриминантного анализа по всем 24 переменным на 5 групп (по классификации K-средних)

Матрица классификации Строки: Наблюдаемая классификация, Колонки: Предсказанная классификация.						
	Percent	G_1:1	G_2:2	G_3:3	G_4:4	G_5:5
G_1:1	98,3607	60	0	0	0	1
G_2:2	85,1064	1	40	3	0	3
G_3:3	91,5663	2	0	76	1	4
G_4:4	93,8461	0	0	2	61	2
G_5:5	100,0000	0	0	0	0	99
Total	94,6479	63	40	81	62	109

Полученная классификация показала высокую точность отнесения пациентов (образцов опухоли) к заданным группам.

При этом, наилучшая классификация получена для групп 1 и 5, а худшие для группы 2. Следует отметить общий высокий процент классификации, который составил 94,4 процента. Таким образом, мы использовали дополнительную статистическую проверку полученного разделения проанализированной нами популяции на группы. Метод дискриминантного анализа подтвердил высокую достоверность отнесения объектов к определенным группам, отличающимся по особенностям экспрессионного профиля генов, т.е. по молекулярному фенотипу.

В таблице 3.41 приводятся значения функции классификации для полученных дискриминантных функций, которые могут быть использованы для вычисления при проверке вновь внесенных образцов, например контрольной группы.

Таблица 3.41 — Функции классификации для 5 групп на основании дискриминантного анализа.

	G_1:1	G_2:2	G_3:3	G_4:4	G_5:5
lnKI67	3,201	3,3937	3,0221	3,3392	3,523
lnSTK15	-0,657	-0,7218	-1,6590	-1,5852	-1,201
lnCCNB1	1,966	2,5401	1,6754	2,0616	2,000
lnCCND1	-0,025	-0,6586	-0,0189	0,4181	-0,024
lnMYC	1,489	2,0531	1,3472	0,9436	1,298
lnMYBL2	4,026	3,3051	3,4995	4,1116	3,641
lnP16INK4a	2,961	2,9389	2,6643	2,3021	2,716
lnPTEN	9,505	10,0174	9,3005	9,6497	9,469
lnBIRC5	-1,696	-0,4698	-1,3247	-0,6575	-1,259
lnBCL2	0,034	-0,4214	-0,4116	0,0209	-0,262
lnBAG1	-0,011	-0,7851	-0,6226	-0,7397	-0,964
lnTERT	0,559	2,0340	0,5785	1,6199	2,408
lnNDRG1	-1,337	-0,4283	-0,9640	-0,0639	-0,794
lnESR1	2,453	1,9514	2,5181	2,7451	2,463
lnPGR	0,451	-0,2553	0,4235	0,5219	0,416
lnHER2	-1,486	-1,5635	-1,2621	-1,3122	-1,227
lnGRB7	3,212	2,4776	2,5730	2,3853	2,987
lnMGB1	3,168	1,4929	2,2864	1,8202	3,079
lnMMP11	2,170	1,1393	1,2263	1,5789	1,539
lnCTSL2	0,890	1,4277	1,0708	0,8024	0,850
lnCD68	9,565	9,2014	9,3147	9,6002	9,683
Constant	-115,282	-88,1126	-82,8949	-93,4139	-107,888

На рисунке 3.18 показана проекция на плоскость канонических значений для сформированных 5 групп (молекулярных фенотипов), где X-значение канонической функции 1, а Y-значение канонической функции.

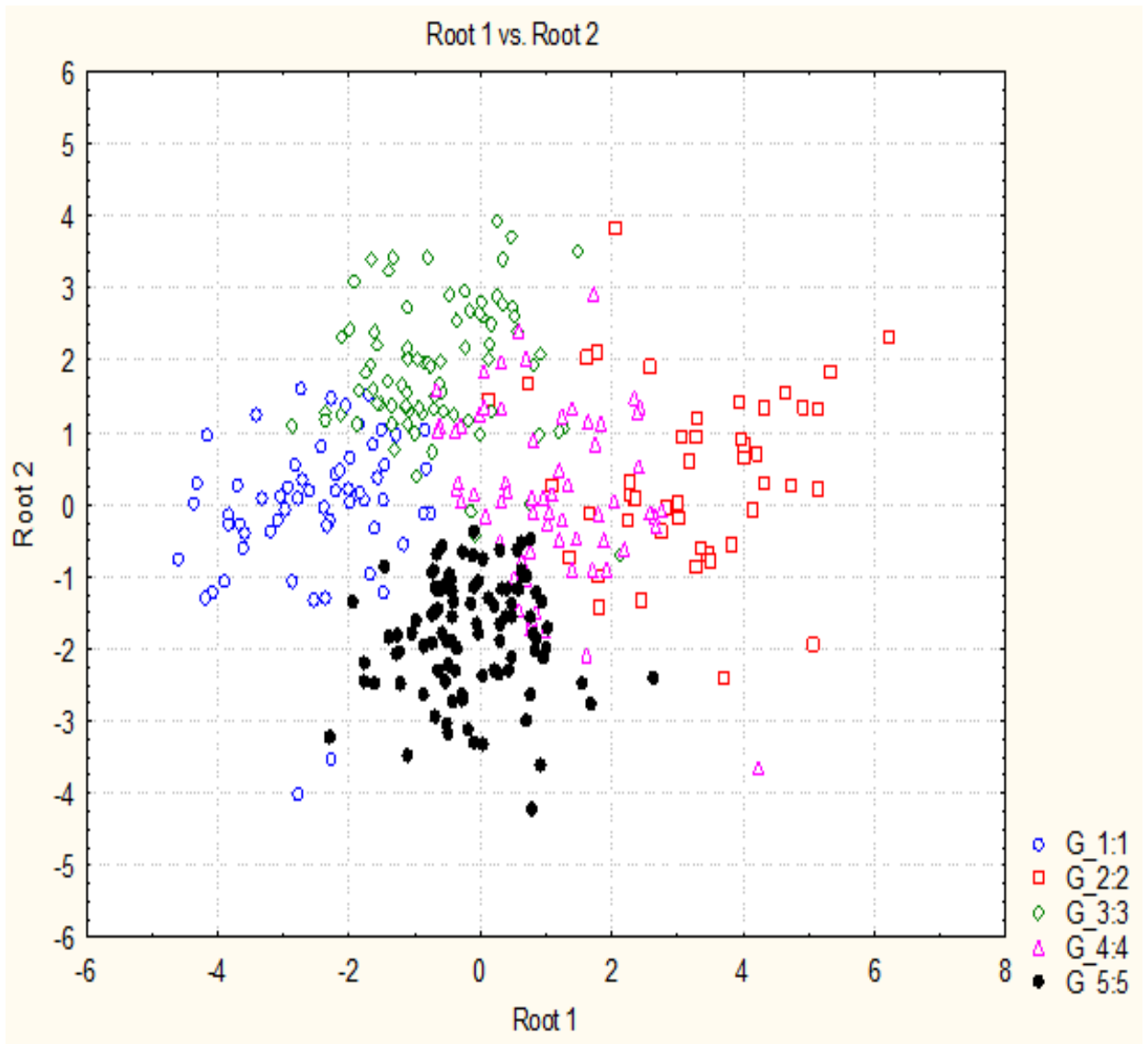


Рисунок 3.18 — График двух канонических функций для полученных 5 фенотипов РМЖ.

Также был проведен анализ возможности разделения образцов ткани РМЖ на группы, на основании полученных профилей экспрессии генов с использованием различных алгоритмов деревьев классификации. Полученная структура дерева классификации представлена на рисунке 3.19.

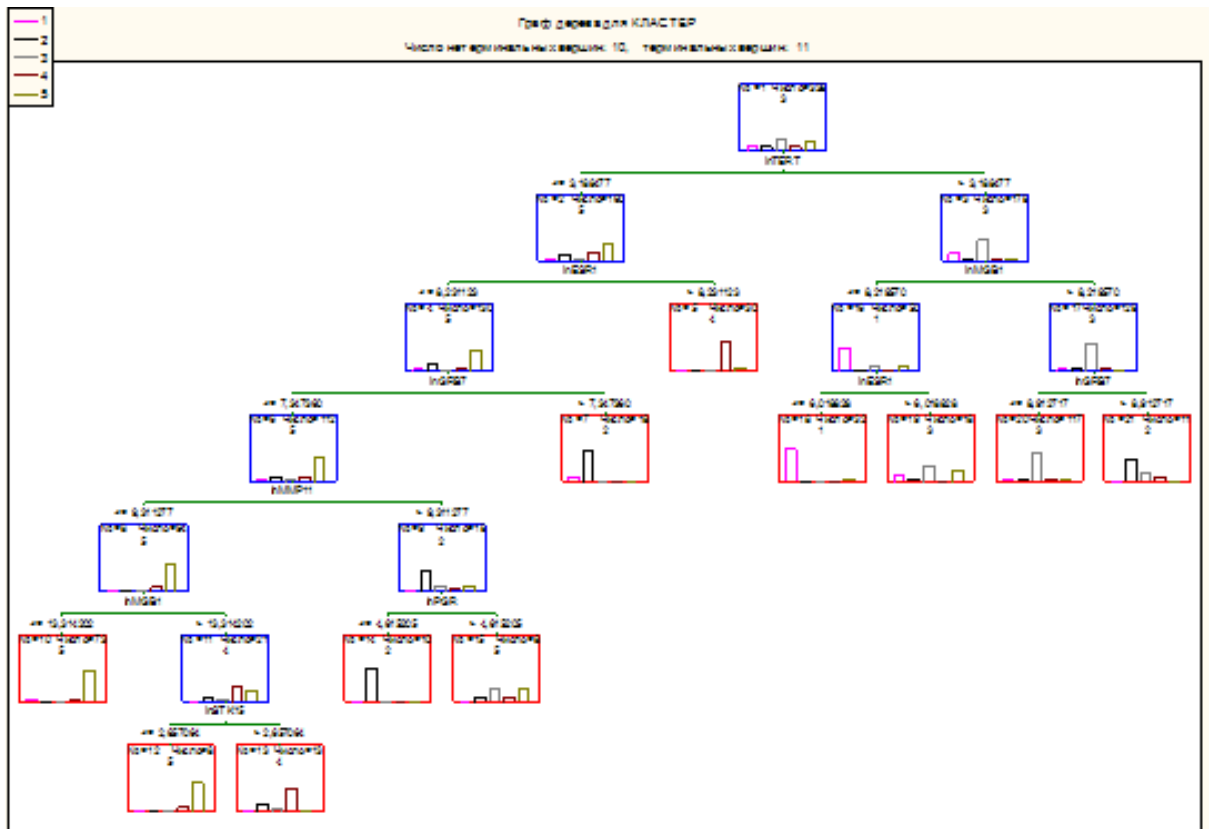


Рисунок 3.19 — Графическое решение дерева классификации с узлами-признаками.

Для полученного решения приведена матрица классификации на рисунке 3.20. При этом общая ошибка классификации составила менее 15%.

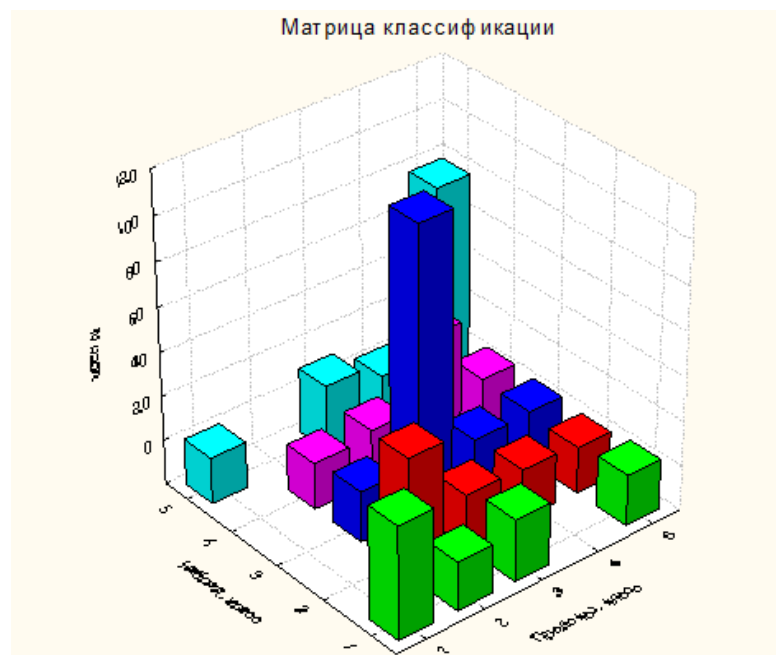


Рисунок 3.20 — Матрица классификации полученного решения для 5 фенотипов РМЖ.

Анализ полученного графа показывает, что основные гены, участвующие в классификации: TERT, ESR, PGR, MGB, MMP11, GRB7. Т.е. гены Her2 и Ki67, используемые для «суррогатной» классификации на основании ИГХ исследования не участвуют в классификации по этой модели.

Таким образом, применение методов кластеризации на основании анализа уровня экспрессии генов позволило сгруппировать исследуемые образцы в пять групп. Принципиально важно, что полученные пять групп-кластеров образцов были «устойчивы», т.е. одни и те же образцы попадали в одни и те же кластеры. Использование разных методов кластеризации независимо от математического алгоритма кластеризует образцы на стойкие кластеры, что подтверждает объективное наличие особеннейшей фенотипических свойств полученных групп. С целью выявления решающего правила или ключевых генов, уровни экспрессии которых в наибольшей степени определяют принадлежность образцов к классам, был использован метод деревьев классификации с полным подбором деревьев с одномерным ветвлением по методу CART. Основными (узловыми) генами кластеризации в анализе были KI67, PGR, HER2/neu, а также CCND (рисунок 3.21), то есть гены, кодирующие белки классической модели фенотипирования РМЖ. Интересно, что первое ветвление разделило популяцию на опухоли с высоким и низким уровнем экспрессии PGR; далее среди низкоэкспрессирующих PGR образцов была выделена группа с высокой экспрессией HER2/neu, а среди PGR-высокоэкспрессирующих - группа с низкой экспрессией KI67. Мы считаем, принципиально важным, что количество (и состав) образцов в фенотипических группах были практически идентичными для кластерного анализа и деревьев классификации.

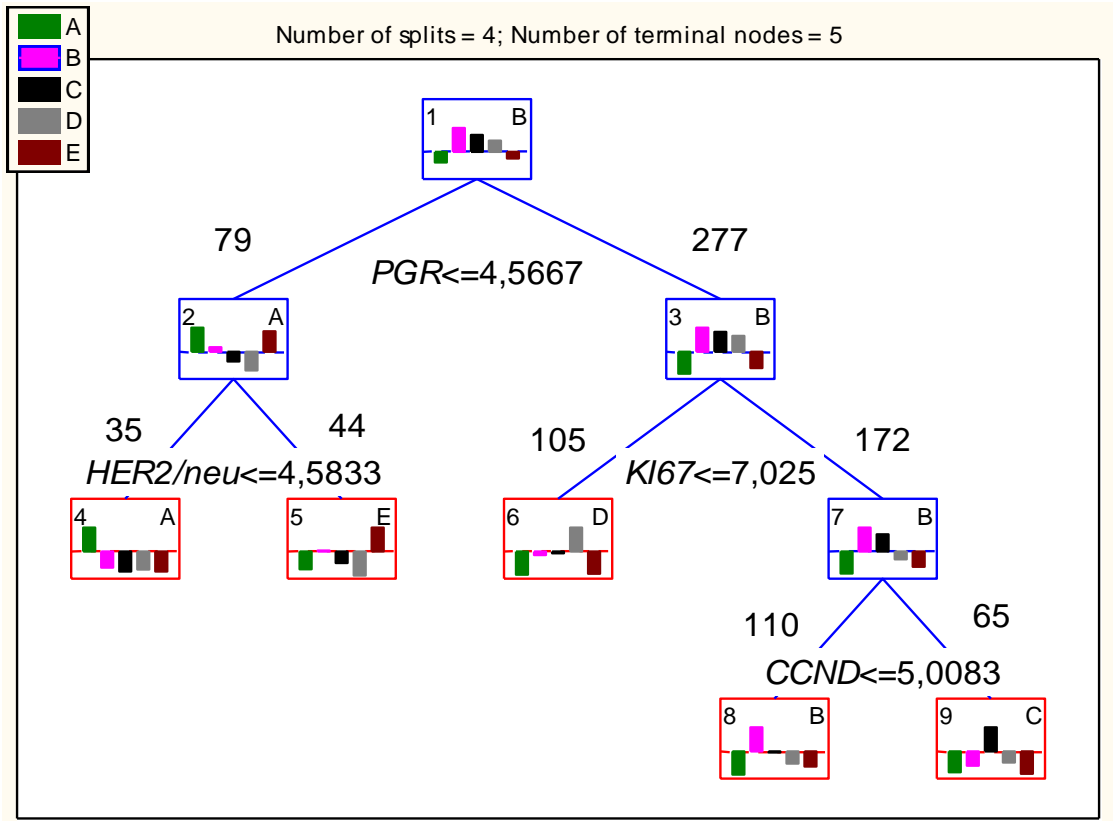


Рисунок 3.21 — Узловые гены классификации с использованием метода деревьев классификации с полным подбором деревьев с одномерным ветвлением по методу CART

Также с целью построения модели классификации был использован кластерный анализ по методу Варда с оценкой евклидова расстояния между исследуемыми объектами (образцами). По результатам анализа все исследуемые образцы были объединены в пять групп, которые в дальнейшем рассматривались как различные фенотипы и были обозначены, соответственно, А, В, С, D и Е. На рисунке 3.22 представлено дерево кластеризации с указанием выявленных фенотипов.

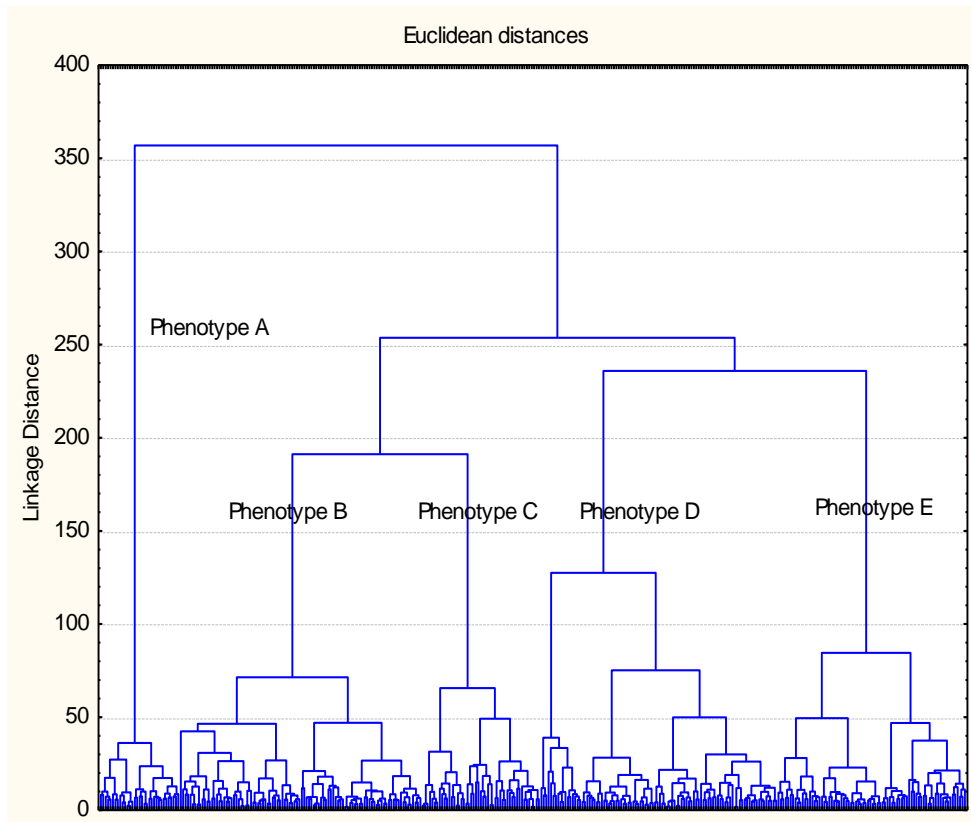


Рисунок 3.22 — Дерево кластеризации исследуемых образцов ткани ($n=359$) по методу Варда с определением евклидова расстояния между объектами (образцами). В фенотип А было включено 32 из 359 образцов (8,9%), в фенотип В - 111 образцов (30,9%), в фенотип С - 70 образцов (19,5%), в фенотип D - 106 образцов (29,5%) и в фенотип Е - 40 образцов (11,2%).

С целью верификации результатов кластеризации была использован линейный дискриминантный анализ. Результаты анализа, показали, что при использовании идентификатора принадлежности к фенотипическим классам, полученном на основании применения метода деревьев классификации (метод CART) дискриминантный анализ определяет принадлежность к группам с высокой эффективностью. Общая точность совпадения классификаций составила 91,8%. В таблице 3.42 представлен сравнительный анализ наблюдаемого (по результатам кластерного анализа) и прогнозируемого (на основе линейного дискриминантного анализа) распределения образцов по фенотипическим группам. На рисунке 3.23 продемонстрировано распределение образцов по

фенотипическим группам согласно каноническим значениям двух дискриминантных функций.

Таблица 3.42 — Анализ соответствия наблюдаемого и прогнозируемого распределения образцов в фенотипические группы на основании кластерного и дискриминантного методов анализа. Строки в таблице обозначают наблюдаемое количество образцов в группах, столбцы – прогнозируемое количество.

Фенотип	Вероятность совпадения (%)	A	B	C	D	E
A	93,54839	29	0	2	0	0
B	93,63636	2	103	2	1	2
C	87,14286	1	6	61	2	0
D	92,38095	0	2	4	97	2
E	90,00000	0	0	1	3	36
Общая точность классификации (%)	91,84171	32	111	62	111	40

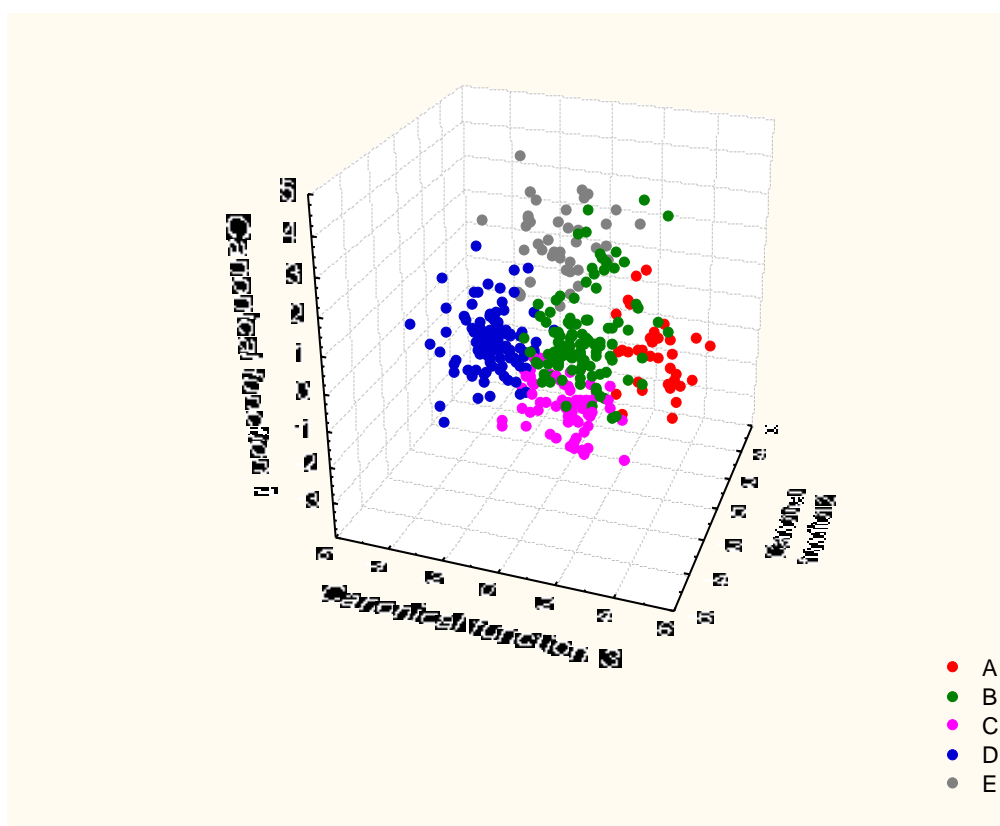


Рисунок 3.23 — Распределение образцов по фенотипическим группам согласно каноническим значениям двух дискриминантных функций.

Совпадение результатов кластерного анализа, деревьев классификации и линейного дискриминантного анализа, а также логика включения генов в дискриминирующую модель свидетельствуют о существовании значительных фенотипических отличий в исследуемых образцах, а также о способности выбранных для анализа генов описывать эти отличия на уровне статистической значимости.

Так же важно оценить, насколько закономерности экспрессии комплекса генов, включенных в исследуемую панель соответствуют существующим в литературе представлениям о молекулярных фенотипах рака молочной железы.

3.5.2 Оценка уровня экспрессии мРНК генов, используемых в классической модели фенотипирования

Соглашение, принятое на конференции в Сет-Галлен (Goldhirsch A., 2011) рекомендовало суррогатный метод определения молекулярного фенотипа РМЖ, основанный на иммуногистохимической оценке 4 маркеров (KI67, рецепторы эстрогена, прогестерона и HER2/neu). На основании этого соглашения выделяют следующие фенотипы: люминальный А, люминальный В, люминальный В – HER2/neu негативный, HER2/neu-позитивный и тройной-негативный фенотип.

Был проведен анализ закономерности отличий уровней экспрессии мРНК генов, кодирующих эти 4 маркера, исследованных образцов в группах, полученных на основании кластеризации различными статистическими методами. Уровень экспрессии KI67 был максимальным в образцах с фенотипом А и минимальным в образцах с фенотипом D (рисунок 3.24). Для фенотипов В, С и Е экспрессия KI67 статистически значимо не отличалась ($p > 0,05$). Здесь и далее данные о средних значениях и стандартных отклонениях уровней экспрессии исследуемых генов, а также об уровне статистической значимости межгрупповых отличий с поправкой на множественность сравнений представлены в дополнительных таблицах 1 и 2.

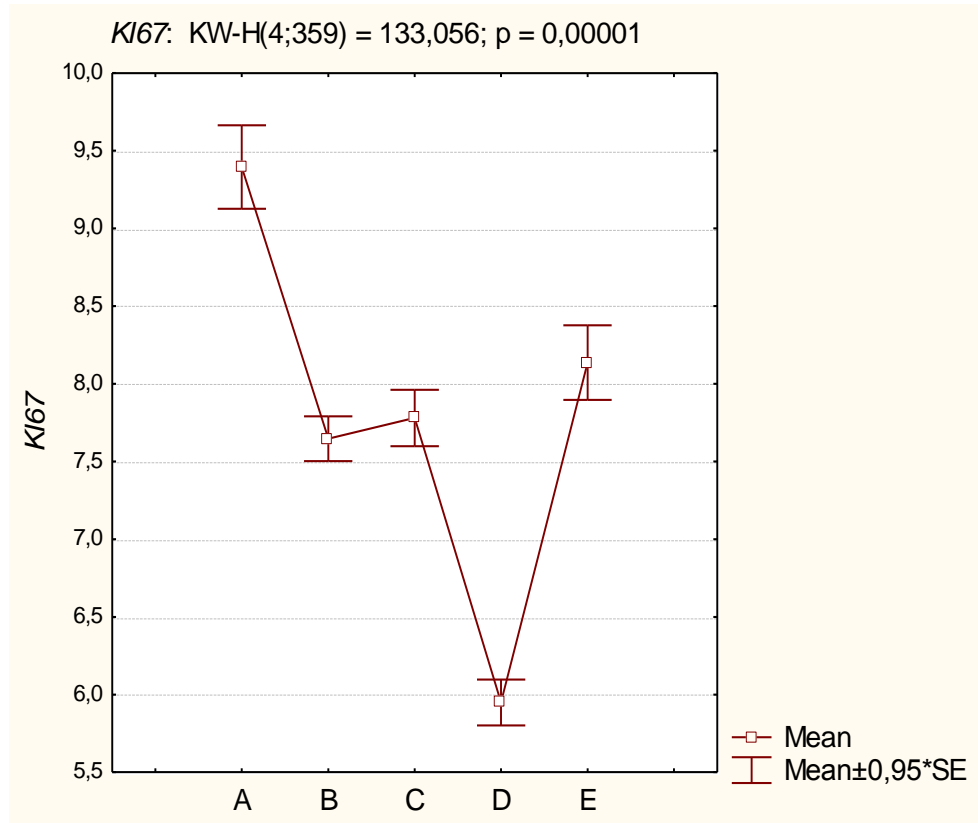


Рисунок 3.24 — Отличие уровня экспрессии KI67 в группах, сформированных на основании кластерного анализа профиля экспрессии генов.

При анализе экспрессии гена, кодирующего рецепторы эстрогена (ESR1), максимальная экспрессия была отмечена для образцов фенотипов B, C и D без статистически значимых отличий внутри групп. Уровень экспрессии рецепторов прогестерона (PGR) также был наиболее высоким для образцов этих же фенотипов, достигая максимальных значений для фенотипа D, и не отличался по уровню экспрессии в группах B и C. Наиболее низкий уровень экспрессии ESR1 и PGR отмечен для образцов фенотипа A (рисунок 3.25).

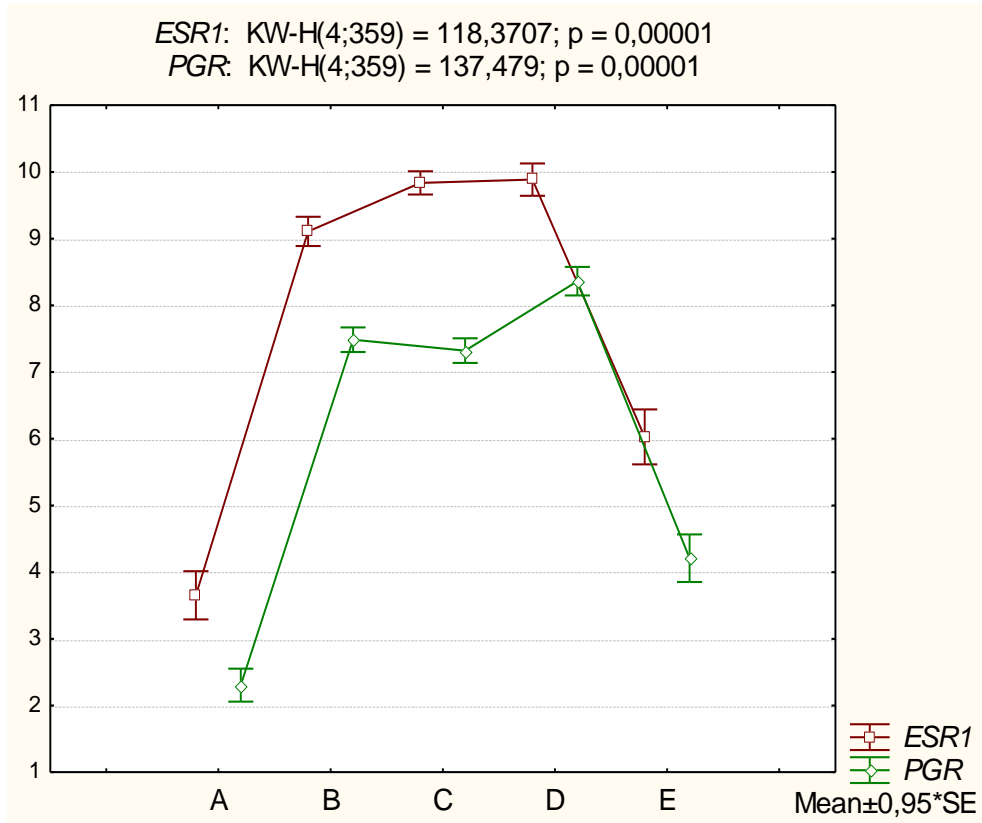


Рисунок 3.25 — Отличие уровней экспрессии генов ESR1 и PGR в группах, сформированных на основании кластерного анализа профиля экспрессии генов.

Уровень экспрессии HER2/neu был минимальным в образцах с фенотипом А, тогда как для фенотипа Е были отмечены максимальные значения уровня экспрессии этого гена. Среди группы эстроген-позитивных фенотипов (В, С, D) экспрессия HER2/neu была статистически значимо ниже в образцах с фенотипом С, тогда как для фенотипов В и D статистически значимых отличий не получено (рисунок 3.26).

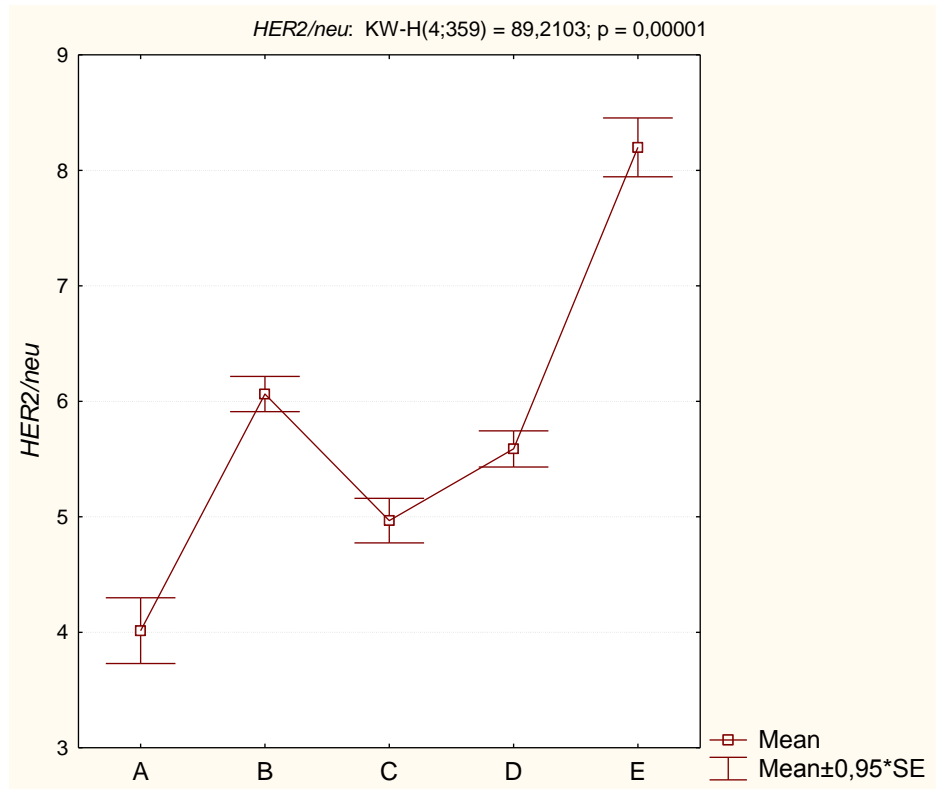


Рисунок 3.26 — Отличие уровней экспрессии HER2/neu в группах, сформированных на основании кластерного анализа профиля экспрессии генов.

Таким образом, фенотипа А характеризовался максимальным уровнем экспрессии KI67, отражающим высокую пролиферативную активность, при минимальной экспрессии рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu. Фенотипы В, С и D характеризовались наиболее высокой экспрессией ESR1 и PGR при этом уровень пролиферативной активности (уровень KI67) был низким, а для фенотипа D пролиферативная активность была минимальной. Среди рецептор-позитивных фенотипов с высокой пролиферативной активностью (В и С) для фенотипа В отмечена более высокая экспрессия HER2/neu. Для фенотипа Е была отмечена умеренная пролиферативная активность и максимальный среди всех наблюдаемых групп уровень экспрессии HER2/neu.

Закономерности отличий уровней экспрессии генов классических маркеров при сравнительном анализе в выявленных группах подтвердили результаты деревьев классификации, где значения экспрессии KI67, PGR, ESR1 и HER2/neu

были выбраны в качестве решающего правила для выделения базального, люминального и HER2/neu-позитивного фенотипов.

Полученные результаты по закономерности распределения средних уровней экспрессии 4 генов в выявленных группах позволили сопоставить выявленные «слепыми» статистическими методами классификации фенотипы с существующей стратификацией молекулярных фенотипов РМЖ на основе классических ИГХ маркеров фенотипирования. Полученный в исследовании фенотип А, отличающийся максимальной пролиферативной активностью и минимальной экспрессией рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu, по-видимому, является базальным (тройным негативным) фенотипом. Фенотипы В, С, и D согласно уровню экспрессии ESR1 и PGR могут быть отнесены к люминальному фенотипу, при этом фенотип D с минимальной пролиферативной активностью, вероятно, соответствует люминальному фенотипу А, фенотип С – люминальному В HER2/neu-негативному, а фенотип В – люминальному В HER2/neu-позитивному фенотипу. Фенотип Е с самой высокой экспрессией HER2/neu может быть отнесен к HER2/neu позитивному фенотипу. В таблице 3.43 соотнесены выявленные нами в исследовании и классические фенотипы.

Таблица 3.43 — Сопоставление сформированных на основании кластерного анализа профиля экспрессии генов фенотипов с «классическими».

Классический фенотип	Выявленный фенотип
Базальный	А
Люминальный В HER2/neu-позитивный	В
Люминальный В HER2/neu-	С
Люминальный А	Д
Her2-позитивный	Е

Таким образом, уровни экспрессии генов, кодирующих классические ИГХ маркеры фенотипирования РМЖ, в сформированных группах, на основании «слепых» методов классификации уровней экспрессии комплекса генов (всего 21 ген) имеют закономерности соответствующие классическим представлениям о

молекулярной феноменологии РМЖ. Полученные результаты с одной стороны подтверждают имеющиеся литературные данные о гетерогенности молекулярного фенотипа ткани РМЖ, а с другой показывают, что выделение этих фенотипов возможно с помощью различных наборов фенотипических признаков. Практическое значение имеет надежность используемой модели и принципов регистрации фенотипических показателей. Как показывают полученные результаты, используемая в работе комбинация признаков (уровень экспрессии мРНК генов) и метод их оценки (количественный ПЦР) дают стабильное решение (классификация на однотипные группы) при применении различных статистических методов. При этом, получаемые классы по фенотипическим характеристикам соответствуют выделяемым в литературе «классическим» 5 молекулярным фенотипам. На основании полученных результатов было проведено исследование, насколько, выделенные методом молекулярного фенотипирования классы отличаются по клиническим характеристикам, после чего сравнили получаемую классификацию, с классификацией на основе стандартного ИГХ метода.

3.5.3 Отличия уровней экспрессии генов, не включенных в «суррогатный» ИГХ метод в выявленных фенотипах и анализ безрецидивной выживаемости

Помимо выявленных отличий классических маркеров фенотипирования для сформированных на основании кластерного анализа групп были проанализированы закономерности экспрессий генов, не входящих в группу, анализируемую при определении фенотипа методом ИГХ (Приложение таблицы 3 и 4). Так для фенотипа А был характерен высокий уровень экспрессии генов контроля пролиферации: CCNB1, MYBL2, P16ink4A, гена апоптоза BIRC5, а также гена TERT и CTSL2, тогда как экспрессия опухолевого супрессора PTEN и MGB1 была самой низкой среди исследованных групп. Также низкой была экспрессия генов, ассоциированных с молекулярным каскадом рецепторов эстрогена и генов CCND, BCL2 и BAG1, все это подтверждает рецептор-негативную природу фенотипа А. Пролиферативная активность фенотипа Е по

ряду генов контроля пролиферации (CCNB1, MYC, MYBL2, PTEN) не отличалась от фенотипа А, однако значения экспрессии P16ink4A, TERT, BCL2, гомолога HER2/neu гена GRB7, MMP11 и CTSL2 были уникальными для данного фенотипа. Среди эстроген-позитивных фенотипов наиболее интересные закономерности отмечены для фенотипа D, для которого наблюдался статистически значимо минимальный среди всех исследуемых образцов уровень экспрессии активаторов пролиферации STK15, CCNB1, MYBL2, а также ингибитора апоптоза BIRC5 и гена TERT. Интересно, что в ряде образцов этого фенотипа экспрессия мРНК KI67 (12 из 106; 11,3%), STK15 (25 из 106; 23,6%), BIRC5 (45 из 106; 42,5%) и TERT (101 из 106; 95,2%) отсутствовала полностью. Такое уникальное сочетание низкой пролиферативной и антиапоптотической активности может указывать на сохранение сравнительно высокой степени дифференцировки опухоли. Уровень экспрессии P16ink4A, BCL2, BAG1, ESR1 и CTSL2 статистически значимо не отличался в образцах рецептор-позитивного фенотипа и был уникальной характеристикой фенотипов по сравнению с А и Е.

Также была проанализирована безрецидивная выживаемость больных в выявленных фенотипических группах. Для 318 из 356 образцов РМЖ I-II стадии (89,3%), включенных в исследование, была получена информация о 10-летней безрецидивной выживаемости. Анализ выживаемости по методу Каплана-Майера продемонстрировал наличие статистически значимых отличий для всех выявленных фенотипов ($p=0,00003$) (рисунок 3.27).

В группе пациентов с фенотипом А прогрессирование было отмечено у 11 из 28 человек (39,3%). У пациентов с фенотипом Е прогрессирование отмечено у 16 из 32 (50%) пациентов. Наиболее благоприятный прогноз отмечен для фенотипа D, где прогрессирование отмечено только у 9 из 88 пациентов (10,2%). Наибольшее количество рецидивов отмечено у пациентов с фенотипом В (37 из 100 человек; 37%). В группе фенотипа С прогрессирование отмечено у 22 из 70 человек (31,4%).

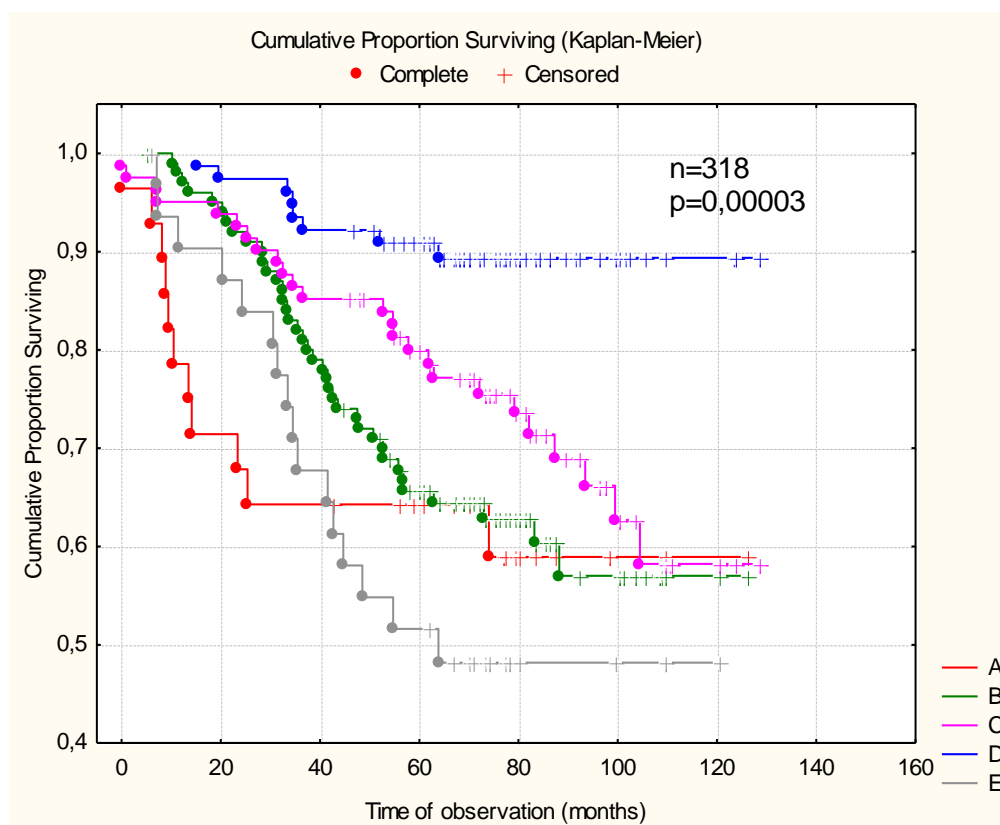


Рисунок 3.27 — Анализ безрецидивной выживаемости больных в зависимости от выявленного фенотипа согласно анализу экспрессии комплекса генов методом РВ-ПЦР.

Результаты анализа выживаемости демонстрируют корреляцию экспрессионного (молекулярного) портрета опухоли и безрецидивной выживаемости больных. В частности, это справедливо для рецептор-позитивных фенотипов, где у пациентов, с наименее агрессивным фенотипом D, отмечена максимальная частота десятилетней безрецидивной выживаемости, значения которой были выше по сравнению с фенотипами B и C, характеризующимися более высокой пролиферативной и антиапоптотической активностью.

Таким образом, анализ фенотипа с многопараметрической оценкой мишеней, характеризующих фундаментальные фенотипические особенности опухоли, демонстрирует не только конкордантность изменений уровней экспрессии генов, описывающих процессы пролиферации, апоптоза и др., но и указывает на связь этих процессов с риском прогрессирования заболевания.

3.5.4 Оценка воспроизводимости фенотипирования с использованием редуцированной модели и сравнительный анализ выживаемости

Наличие корреляции между фенотипической картиной опухоли на основе анализа экспрессии 24 генов и риском рецидивирования демонстрирует наличие корреляции выявленных фенотипов с прогнозом РМЖ. Однако, классическими являются только четыре маркера фенотипирования (KI67, ESR1, PGR и HER2/neu), и в связи с этим интересным может быть определение устойчивости классификации при использовании в модели только этих классических маркеров.

С целью оценки сравнительной классификации при использовании редуцированной модели генов, кодирующих классические маркеры фенотипирования (KI67, ESR1, PGR и HER2/neu), нами была повторно выполнена классификация исследуемых образцов методом линейного дискриминантного анализа. Как видно из таблицы 3.44, вклад маркеров в модель дискриминации был статистически значим.

Таблица 3.44 — Дискриминантная мощность (лямбда Уилкса) и уровень значимости для генов, включенных в модель классификации

Ген	Лямбда Уилкса	Частная лямбда Уилкса	F-значение	P
<i>KI67</i>	0,493036	0,901561	9,49925	0,0000001
<i>ESR1</i>	0,493141	0,901369	9,51985	0,0000001
<i>PGR</i>	0,491655	0,904092	9,22912	0,0000001
<i>HER2/neu</i>	0,544048	0,817027	19,48357	0,0000001

Общая точность классификации (то есть совпадение групп по результатам расширенной и редуцированной модели) составила 60,4%, максимальная точность 87,5% наблюдалась для фенотипа А. В таблице 3.45 представлена матрица классификации совпадения определяемых фенотипов.

Таблица 3.45 — Анализ соответствия попадания в фенотипические группы на основании сокращенной и полной панели генов (строки в таблице обозначают

наблюдаемое количество образцов в группах; столбцы – прогнозируемое количество).

Фенотип	Вероятность совпадения (%)	A	B	C	D	E
A	87,50000	28	0	1	0	3
B	55,85585	2	62	10	25	12
C	41,42857	0	30	29	11	0
D	66,98113	2	25	7	71	1
E	67,50000	6	6	0	1	27
Общая точность классификации (%)	60,44568	38	123	47	108	43

Интересно, что классификация по трем основным фенотипам (базальный, люминальный и HER2/неу-позитивный) воспроизвела первичные результаты с точностью 90,2% (данные не представлены). На рисунке 3.28 представлен график распределения фенотипов согласно представленной классификации.

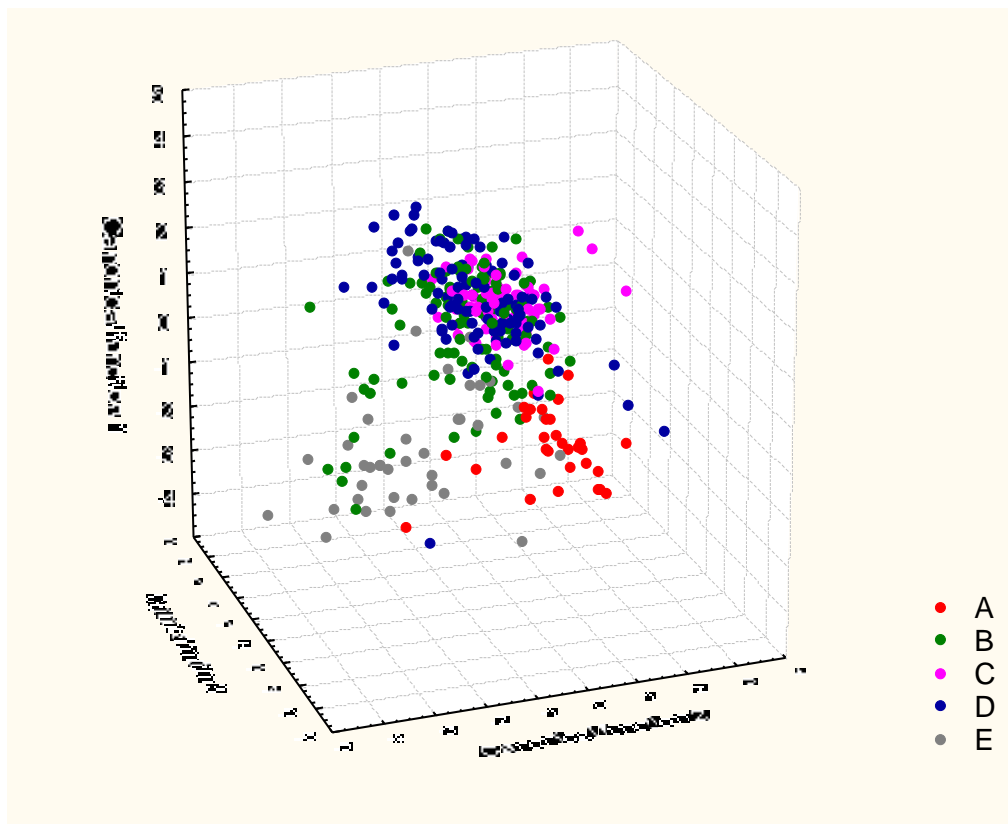


Рисунок 3.28 — Распределение образцов по фенотипическим группам согласно каноническим значениям двух дискриминантных функций

Из рисунка видно, что центры фенотипов А и Е несколько смещены от поля, образованного образцами фенотипов В, С и D. При этом образцы В, С, D рецептор-позитивных (люминальных) фенотипов неразделимы между собой (конкордантность результатов 56-67%). Подобный результат может свидетельствовать о том, что, хотя классические маркеры и отражают закономерности отличий различных фенотипов, они являются явно недостаточными для прецизионной оценки индивидуального фенотипа опухоли. В случае редукции модели фенотипирования до четырех маркеров происходит значительное сближение центров групп и, как следствие, ошибки оценки принадлежности пациентов к той или иной группе – молекулярному фенотипу.

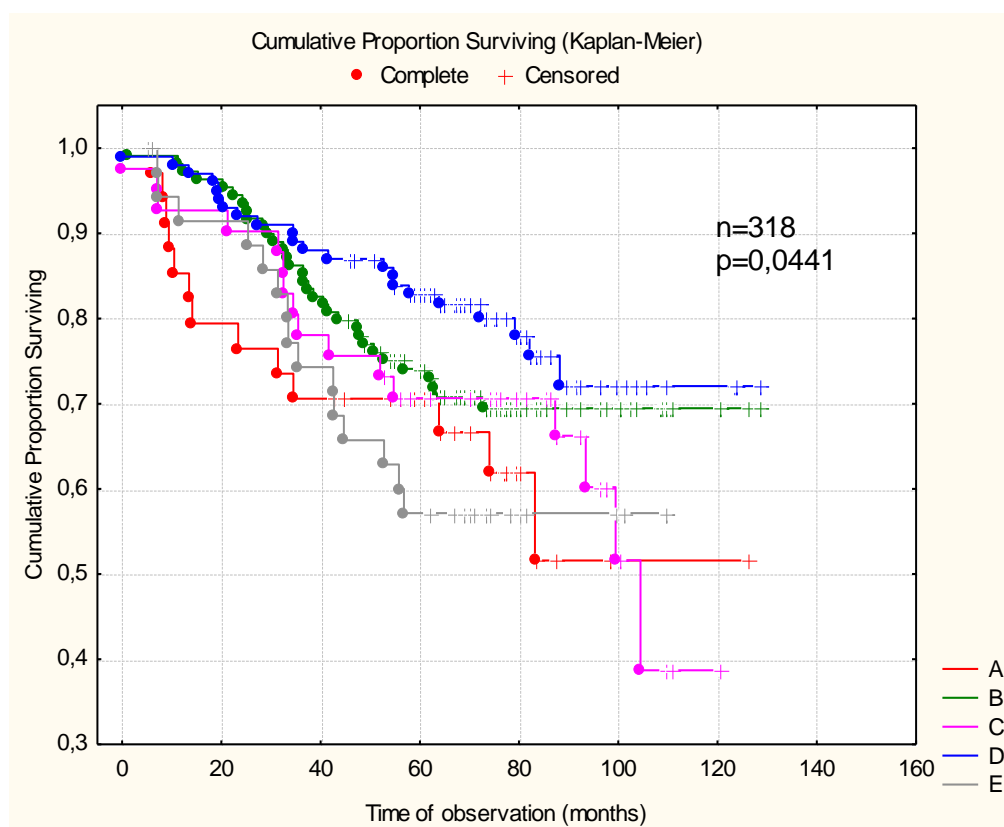


Рисунок 3.29 — Анализ безрецидивной выживаемости больных в зависимости от выявленного фенотипа согласно уровню экспрессии 4 генов.

Это косвенно подтверждается результатами анализа безрецидивной выживаемости во вновь сформированных фенотипических группах (рисунок 3.29), где заметно снижение отличия кривых выживаемости по сравнению с результатами, приведенными на рисунке 3.29, что может отражать

ограниченность (низкую специфичность) модели, использующей только 4 гена для стратификации на 5 фенотипических групп.

Клиническое значение снижения точности классификации в оценке индивидуального фенотипа можно продемонстрировать на примере рецептор-позитивных В, С и D фенотипов. Т.к. образцы фенотипа D характеризуются минимальной пролиферативной активностью, низким риском прогрессирования и, соответственно, для пациентов этой группы возможно использование менее агрессивной терапии (эндокринотерапии). Согласно результатам редуцированной классификации (таблица 3.46) 32 из 106 образцов фенотипа D были неверно распределены в группы более агрессивных фенотипов В и С, что могло бы потребовать проведения более агрессивной терапии. Из этих 32 неверно классифицированных случаев прогрессирование наблюдалось только в 3 (9,3%). С другой стороны, 36 образцов фенотипов В и С были ошибочно классифицированы в менее агрессивный фенотип D. Частота прогрессирования в них составила 36,45% (14 из 36 случаев), что соответствует частоте прогрессирования в первоначальной классификации (таблица 3.46). Соотношение буквенного и «стандартного» наименования фенотипов приведено в таблице 3.43.

Таблица 3.46 — Ошибка классификации фенотипов люминальных А и В при использовании редуцированной модели, а также количество прогрессирований у неверно классифицированных пациентов

Фенотип (расширенная модель)	Кол-во неверно классифицированных по редуцированной модели (%)	Направление ошибки классификации	Кол-во прогрессирования/ Кол-во неверно классифицированных (%)
Люм.В Her2+	25 из 111 (22,5%)	Люм.В Her2+→ Люм.А	14 из 36 (36,5%)
Люм.В Her2-	11 из 70 (15,7%)	Люм.В Her2-→ Люм.А	
Люм.А	32 из 106 (33,9%)	Люм.А→Люм.В	3 из 32 (9,3%)

Таким образом, согласно результатам оценки молекулярных фенотипов на основании редуцированной модели 29 пациенток РМЖ с фенотипом D (27,3%)

могли бы получить излишне агрессивную терапию, тогда как риск прогрессирования, как минимум 14 пациенток с фенотипами В и С (6,5%), мог быть недооценен.

3.5.5 Проспективный анализ эффективности определения молекулярного фенотипа РМЖ

В исследовании был проведен и проспективный сравнительный анализ эффективности определения фенотипа молекулярно-генетическим методом и методом ИГХ. В качестве образцов для этого исследования были использованы парафиновые блоки образцов опухолей, полученных после хирургического этапа лечения у пациенток в период январь-март 2016 г. В процессе обработки парафиновых блоков (получения срезов для ИГХ), делались 2 дополнительных 10 мкм среза для молекулярно-генетического анализа. Далее эти срезы обрабатывались, как описано в главе «Материалы и методы».

Полученные результаты по экспрессии генов в образцах использовались для определения молекулярного фенотипа опухоли на основании алгоритма, полученного при обработке ретроспективной базы данных. В исследование было включено 103 пациентки.

Информация о распределении пациентов по гистологическому диагнозу, степени злокачественности, наличию регионарных метастазов и стадии T N, представлены в таблицах 3.47 – 3.49.

Таблица 3.47 — Распределение образцов опухолей пациенток, включенных в проспективную группу по гистологическому диагнозу.

	Количество	Сумма	Процент	Суммарный процент
Прочие	3	3	2,91262	2,9126
ИПР	79	82	76,69903	79,6117
ИДР	21	103	20,38835	100,0000

Таблица 3.48 — Распределение образцов опухолей пациенток, включенных в проспективную группу, по степени злокачественности.

	Степень злокачественности 1	Степень злокачественности 2	Степень злокачественности 3	Сумма
ИПР	7	58	14	79
ИДР	2	18	1	21
Прочие	3	0	0	3
Всего	12	76	15	103

Таблица 3.49 — Распределение образцов опухоли пациенток, включенных в проспективную группу, по стадиям T, N.

T	N0	N1	N2	N2	Сумма
1	43	7	3	1	54
2	25	16	4	1	46
3	1	0	0	0	1
4	0	1	0	1	2
Totals	69	24	7	3	103

Распределение пациенток по молекулярным фенотипам, определенным на основании ИГХ метода показано в таблице 3.50.

Таблица 3.50 — Распределение образцов опухоли пациенток, включенных в проспективную группу, по молекулярным фенотипам на основании «суррогатного» ИГХ метода.

Гистологический диагноз	Прочие	ИПР	ИДР	Всего
Люминальный А	3	24	5	32
Люминальный В Her2 neg	0	19	8	27
Люминальный В Her2 pos	0	15	4	19
Her2 positive	0	10	0	10
Тройной негативный	0	10	4	14
Сумма	3	78	21	102

Были использованы различные методы классификации для оценки совпадения определения фенотипа методом ИГХ и методом, основанном на

определении уровня экспрессии комплекса генов, разработанного и использованного в работе.

Результаты сравнительной классификации приведены в таблице 3.51.

Таблица 3.51 — Сопоставление двух методов распределения пациентов по молекулярным фенотипам. Горизонтальные строки – определение ИГХ, столбцы – определение молекулярно-биологическим методом.

	%	Люминальный А	Люминальный В_Her2 negativ	Люминальный В_Her2 pozitiv	Her2-позитивн.	Тройной негативн.
Люминальный А	62,5	15,0	5,0	3,0	1,0	0,0
Люминальный В_Her2 negativ	56,5	9,0	13,0	1,0	0,0	0,0
Люминальный В_Her2 pozitiv	53,3	4,0	3,0	8,0	0,0	0,0
Her2-позитивн.	88,9	0,0	1,0	0,0	8,0	0,0
Тройной негативный	60,0	1,0	1,0	1,0	1,0	6,0
Total	61,7	29,0	23,0	13,0	10,0	6,0

Приведенная таблица показывает, что общий процент совпадений не превышает 61,7%. Полученные в работе результаты совпадают с имеющимися опубликованными в 2015-2016 гг. данными по аналогичным проспективным исследованиям, исследующих сравнение ИГХ и молекулярной классификации на основании коммерческой системы PAM50. Эти публикации показывают, что при планировании лечения на основе ИГХ происходит ошибочное назначение химиотерапии для пациентов группы с молекулярным фенотипом «Люминальный А», отнесенных ошибочно к более агрессивным фенотипам, и не оправданное снижение программ лечения для групп, ошибочно отнесенных к люминальному фенотипу А. Процент ошибок, приводимый в этих публикациях, близок к величинам, полученным нами в проспективной группе.

3.5.6 Прогноз рецидивирования на основании математической модели, включающей профиль экспрессии генов в ткани опухоли

Значительное количество исследований посвящено вкладу адъювантной химиотерапии в снижении количества рецидивов, как местных, так и отдаленных, а также увеличению общей продолжительности жизни для пациенток, имеющих различные неблагоприятные факторы прогноза в различных сочетаниях. В настоящее время, наблюдается снижение смертности от РМЖ, которое связано не только с более ранней выявляемостью образований молочной железе, но и с использованием адъювантных схем как гормональной, так и химиотерапии (Albain K.S., 2004). В работе Mansour EG 1989 г. рассматривается высокий риск рецидивирования в варианте эстроген-негативных опухолей и эстроген-позитивных опухолей в сочетании с размером опухоли более 3 см в диаметре. Для таких групп показано, что включение адъювантной химиотерапии увеличивает безрецидивную выживаемость с 69 до 84 % независимо от менопаузального статуса.

В большом количестве исследований показано, что эффект адъювантной химиотерапии при ранних стадиях рака не зависит от наличия регионарного метастазирования и не оказывает должного эффекта на фоне гормональной терапии. Например, в ходе клинических испытаний B20 показано, что добавление химиотерапии к схеме лечения увеличивает общую выживаемость с 94 до 96%. В других клинических исследованиях показано, что добавление химиотерапии в группе РМЖ пациенток в постменопаузе и имеющих статус ER+ и N+ приводит к увеличению общей 5-летней выживаемости в группе тамоксифеном+ CMF по сравнению с группой в которой использовался только тамоксифен с 80 до 82% (Fisher B., 1997). Отмечается, что не найдены единые факторы неблагоприятного прогноза для ранних стадий РМЖ, а т.к. в большинстве исследований показано, что адъювантная химиотерапия увеличивает безрецидивную и общую выживаемость, имеет место предпочтение назначения АПХТ таким пациенткам. Поэтому является актуальным поиск новых, эффективных факторов прогноза для ранних форм РМЖ. Актуальность лечения ранних стадий РМЖ объясняется

также тем, что внедрение современных программ скрининга и пропаганда необходимости регулярных обследований приводит к тому, что в ряде стран выявление РМЖ на стадии N0 достигает 65-70% (Harbeck N, 2011)

Таким образом, выявление дополнительных неблагоприятных факторов прогноза для пациентов с ранними стадиями РМЖ (T1,2, N0,1) является актуальной задачей современной онкомаммалогии. Используются различные методы уточнения локального статуса, например показатели МРТ (Kim MY ,2013). В настоящее время проводится большое количество исследований направленных на разработку факторов прогноза на основании морфологических (морфометрические номограммы) характеристик опухолевой ткани. Однако наибольший эффект показали исследования, направленные на использование молекулярно-генетических отличий ткани опухоли для построения прогностических моделей (Dowsett M., 2010; Sonnenblick A., 2014).

В данной работе было проведено исследование возможности использования данных, по анализу экспрессии 21 гена (24 гена с учетом референсных генов) в 377 образцах ткани РМЖ, полученных от 216 пациенток, проходивших лечение в ФГБУ РНЦРР с 2002 по 2007 год для построения модели прогноза. Критериями включения в исследование были размер опухоли до 5 см, отсутствие или не более 3 метастатических лимфоузлов по данным патоморфологического исследования, отсутствие неoadьювантной полихимиотерапии. Медиана наблюдения составила 93 [72,8 – 119,4 (25-75 процентиля)] месяца, прогрессирование отмечено в 109 (33,1%) случаях. В таблице 3.52 показана общая частота рецидивирования в обследованной группе пациенток.

Таблица 3.52 — Частота рецидивирования в обследованной группе пациенток.

Рецидив	Частота	Кумул.	Процент
Да	109	109	29,14439
Нет	220	329	58,82353
Пропущ.	45	374	12,03209

В зависимости от размера опухоли (Т) риск возникновения рецидива возрастал (таблица 3.53).

Таблица 3.53 — Распределение рецидивов по группам в зависимости от размеров опухоли Т1 и Т2.

Да — группа с рецидивированием, нет — группа без рецидивов				
	N=296	T1	T2	Всего
Частота	Да	32	62	94
% по столбцу		27,12%	34,83%	
% по строке		34,04%	65,96%	
% по таблице		10,81%	20,95%	31,76%
Частота	Нет	86	116	202
% по столбцу		72,88%	65,17%	
% по строке		42,57%	57,43%	
% по таблице		29,05%	39,19%	68,24%
Частота	Всего	118	178	296
% по таблице		39,86%	60,14%	100,00%

Как видно из таблицы частота рецидивирования в группе Т2 составила 34.8% по сравнению с Т1 (27.1%) отличия достоверны.

Так же была оценена частота распределения рецидивов в зависимости от величины N (таблица 3.54).

Таблица 3.54 — Распределение рецидивов по группам в зависимости от N.

	N=305	N0	N1	N2	Всего
Частота	Да	45	36	19	100
% по столбцу		26,47%	39,13%	44,19%	
% по строке		45,00%	36,00%	19,00%	
% по таблице		14,75%	11,80%	6,23%	32,79%
Частота	Нет	125	56	24	205
% по столбцу		73,53%	60,87%	55,81%	
% по строке		60,98%	27,32%	11,71%	
% по таблице		40,98%	18,36%	7,87%	67,21%
Частота	Всего	170	92	43	305
% по таблице		55,74%	30,16%	14,10%	100,00%

Анализ таблицы 3.54 показывает, что частота рецидивирования растет при увеличении N с 26,47% при N0 до 39,13% при N1 и до 44,19% при N2. Эти результаты также совпадают с данными литературы.

Если решать задачу прогноза с помощью метода дискриминантного анализа и произвести построение модели классификации/дискриминации всей исследованной группы пациентов на две группы: группу с прогрессированием и группу без прогрессирования независимо от примененного вида адъювантной терапии, то результаты классификации не очень эффективны, особенно для группы рецидивирования, хотя общая эффективность классификации составляет около 77% (таблица 3.55).

Таблица 3.55 — Классификационная матрица прогнозирования рецидива на основании данных регионарного метастазирования.

	Percent	нет	да
Нет	87,03704	141	21
Да	60,78431	40	62
Total	76,89394	181	83

Для поиска более эффективных алгоритмов прогноза рецидивирования также были исследованы другие методы классификации. На первом этапе был исследован метод «деревьев классификации» (этот метод, позволяет предсказывать принадлежность наблюдений или объектов к тому или иному классу категориальной зависимой переменной в зависимости от соответствующих значений одной или нескольких предикторных переменных. Построение деревьев классификации - один из наиболее важных методов, используемых при проведении начального поиска возможных решений (в современном статистическом анализе этот этап называется «добыча данных»).

Цель построения деревьев классификации заключается в предсказании (или объяснении) значений категориальной зависимой переменной, и поэтому данный метод тесно связаны с более традиционными методами: дискриминантным

анализом , кластерным анализом и методом нелинейного оценивания. В результате применения метода деревьев классификации удалось найти решение с удовлетворительными параметрами эффективности, которые приведены в таблице 3.56.

Таблица 3.56 — Классификация пациенток на группы с прогрессированием и без прогрессирования на основании данных по экспрессии 21 гена. В модель входят также данные о возрасте пациента. Метод деревьев классификации.

	Да	Нет	% правильной классификации
Да	46	8	85,1852
Нет	44	194	81,5126
			83,3489

По вертикали - предсказанные, по горизонтали – наблюдаемые значения прогноза.

Полученные с помощью метода «деревья классификации» данные можно представить в виде графического изображения (рисунок 3.30).

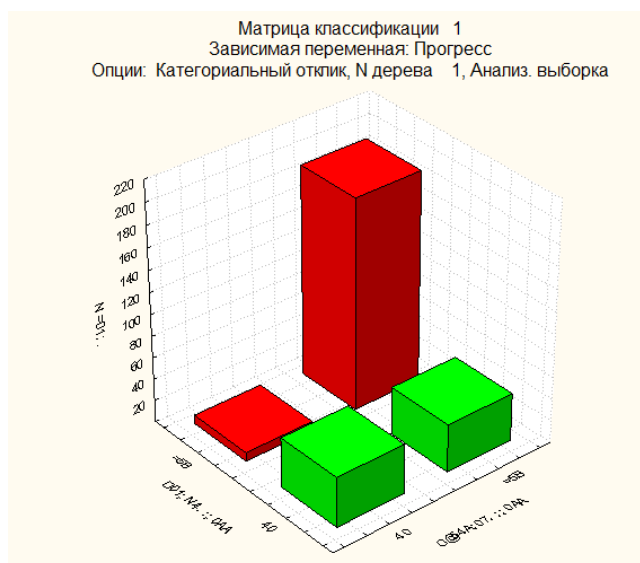


Рисунок 3.30 — Матрица классификации пациентов на группы с прогрессированием и без прогрессирования на основании данных экспрессии 21 гена. Решение получено с помощью деревьев классификации.

Также был применён ряд других методов классификации, таких как классификация на основании К-средних (К-ближайших соседей, расстояние

между объектами – Евклидово), а также метод Байесовских процедур. Применение классификации на основании алгоритма К-средних показало общую эффективность классификации 72,8%. Результаты классификации и матрица ошибок для тестовой выборки приведена в таблицах 3.57 и 3.58.

Таблица 3.57 — Результаты классификации (метод К-средних).

	Всего	Правильная	Неверная	Правильная (%)	Неверная(%)
Да	26	14	12	53,84615	46,15385
Нет	55	43	12	78,18182	21,81818

Таблица 3.58 — Матрица ошибок (метод К-средних).

	Да	Нет
Да	14	12
Нет	12	43

Результаты применения модели, основанной на Байесовских процедурах дали сходные величины эффективности классификации - 73%.

Таким образом, использование широкого набора современных методов классификации показал, что, хотя в лучших вариантах и возможно добиться эффективности модели классификации (и соответственно прогноза рецидивирования) на уровне 83%, внутригрупповая эффективность (особенно для группы с рецидивированием) остается невысокой.

Также была исследована возможность построения общей модели прогнозирования рецидива с помощью метода нейронных сетей. Всего было проанализировано 500 различных сетей, которые включали различные типы сетей: трех и четырех уровней перцептрон, РБФ, линейные модели.

Результаты классификации наиболее эффективных сетей приведены в таблицах 3.59, 3.60.

Таблица 3.59 — Классификация с помощью метода нейронных сетей

	Прогресс.да	Прогресс.нет
Всего	105,0000	204,0000
Правильно	66,0000	157,0000
Ошибочно	39,0000	47,0000
Неизвестно	0,0000	0,0000
% правильных	62,8571	76,9608
% ошибочных	37,1429	23,0392
% неизвестно	0,0000	0,0000

Шрифтом выделена ошибка по группам с рецидивированием (да) и без рецидивирования (нет).

Таблица 3.60 — Подробные результаты модели классификации с применением метода нейронных сетей: сеть, построенная на основе алгоритма РБФ (радиальная базисная функция).

Архитектура	РБФ 15:21-17-1:1
Производительность обуч	0,7225
Контр. производительность	0,6753
Тест. производительность	0,7662
Ошибка обучения	0,4356
Контрольная ошибка	0,4312
Тестовая ошибка	0,4440
Обучение/Элементы	КС,КБ,ПО
Примечания	
Входы	15
Скрытые(1)	17
Скрытые(2)	0

Видно, что и метод нейронных сетей, как правило, наиболее эффективный метод классификации био-медицинских данных (Боженко В.К., 2004), не позволяет в данном случае добиться эффективности выше 75.1%.

Поскольку в исследованной группе пациентки отличались по схеме адьювантного лечения и очевидно, что прогноз в значительной степени зависит от вида примененного лечения при равной стадии, мы провели анализ возможности

построения прогноза в группах пациенток имеющих общие схемы лечения. Всего было сформировано 4 группы. Группа только с адъювантной гормонотерапией, группа без адъювантной терапии, группа с АПХТ и группа с ГТ и АПХТ.

В таблице 6.11 приведено распределение пациенток по видам адъювантной химиотерапии (ГТ-адъювантная гормонотерапия, АПХТ – адъювантная полихимиотерапия) и частотой рецидивирования в группах.

Таблица 3.61 — Распределение пациенток по видам адъювантной химиотерапии

Прогрессирование	АПХТ да/нет	ГТ _да	ГТ _нет	Row
Да	Да	45	29	74
Да	Нет	14	3	17
	Всего	59	32	91
Нет	Да	100	21	121
Нет	Нет	50	3	53
	Всего	150	24	174
	Общее количество			265

Если построить модель прогноза рецидивирования с применением метода дискриминантного анализа для группы пациенток, у которой применялась только адъювантная гормонотерапия (после хирургического этапа лечения), то результаты общей классификации риска рецидивирования существенно возрастают – 93.7% (таблица 3.62).

Таблица 3.62 — Классификационная матрица дискриминантного анализа прогноза рецидивирования в группе пациенток РМЖ с программой лечения: хирургическое + адъювантная ГТ.

	Percent	Да	Нет
да	71,4286	10	4
нет	100,0000	0	50
Total	93,7500	10	54

Из таблицы 3.62 видно, что полученная модель со 100% вероятностью определяет пациенток, у которых при применении только ГТ не будет рецидива, в 29% классификационная матрица допускает ошибку (т.е. относит неблагоприятного пациента в группу без рецидива), однако общая эффективность модели равна 93,7%. Эта величина сопоставима, и, в ряде случаев, превосходит существующие модели прогноза. Однако, было получено, что если применить данную модель для классификации пациенток, получавших только АПХТ без ГТ, то модель абсолютно не работает - процент правильного предсказания прогноза рецидивирования резко снижается (таблица 3.63).

Таблица 3.63 — Классификационная матрица дискриминантного анализа прогноза рецидивирования в группе пациенток, получавших только АПХТ без ГТ.

	Percent	Да	Нет
да	6,89655	2	27
нет	95,23810	1	20
Total	44,00000	3	47

Эти результаты доказывают, что прогноз рецидивирования (т.е. решение, полученное методом дискриминантного анализа данных уровней экспрессии в ткани опухоли) для группы со схемой лечения «хирургическое+ адьювантная ГТ» применим только для этой группы и абсолютно не может быть распространен для групп с другими схемами лечения. В тоже время, если продолжить анализ в подгруппах, с различными схемами терапии и провести дискриминантный анализ для классификации пациенток на группы с рецидивом и без него, в группе, где применялась схема лечения, включающая хирургическое + АПХТ в комбинации с ГТ, то результаты предсказания рецидива составляют 87% (таблица 3.64).

Таблица 3.64 — Классификационная матрица дискриминантного анализа прогноза рецидивирования в группе пациенток с АПХТ в комбинации с ГТ.

	Percent	нет	да
нет	90,41096	66	7
да	82,22222	8	37
Total	87,28814	74	44

Таким образом, использование метода дискриминантного анализа для построения моделей прогноза рецидивирования, для групп пациенток с различными схемами лечения позволяет получить удовлетворительные модели прогноза.

Дальнейший анализ включал ROC анализ (Кривая ошибок или ROC-кривая – графическая характеристика качества бинарного классификатора, зависимость доли верных положительных классификаций от доли ложных положительных классификаций), который показал высокую эффективность классификации в моделях для изолированных групп. Вид ROC кривой для алгоритма классификации полученного для группы «хирургическое лечение+ ГТ) приведен на рисунке 3.31 (площадь под кривой составила 0.943).

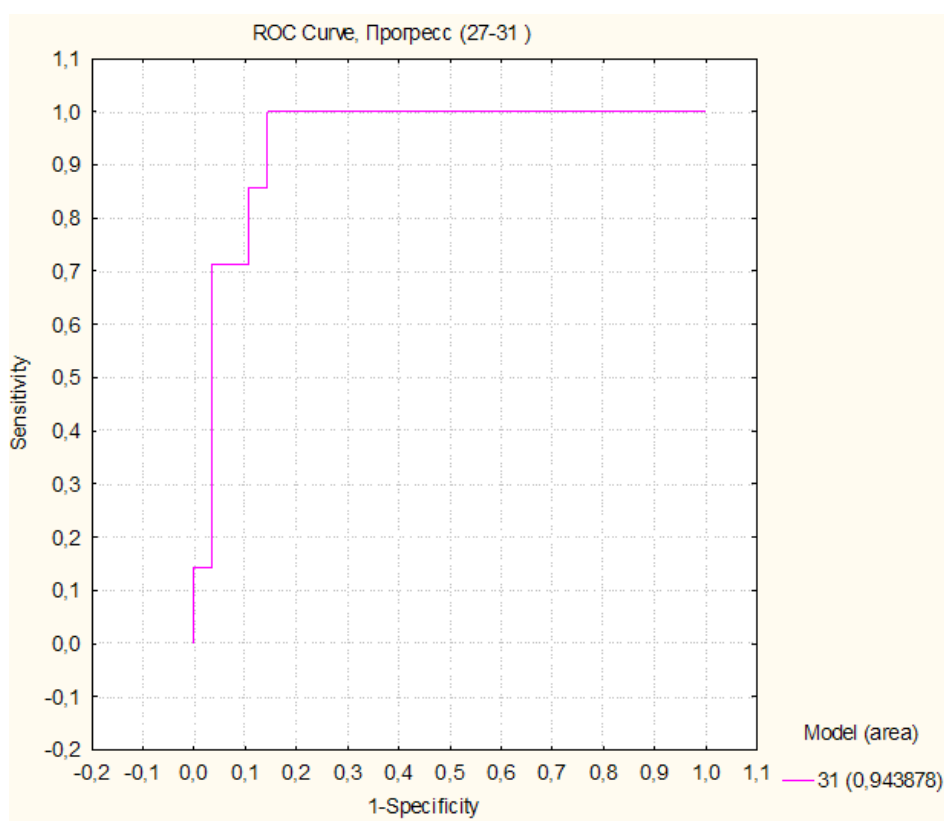


Рисунок 3.31 — ROC кривая для алгоритма классификации полученного для группы пациенток со схемой лечение «хирургическое + ГТ».

Поскольку принадлежность группе (классификация) в дискриминантном анализе определяется на основании значения дискриминантных (канонических)

функций, и чем дальше это значение от границы раздела групп, тем выше вероятность принадлежности в какой-то группе, полученное решение позволяет не только получить решение (классификацию к той или иной группе), но и вероятность (в какой-то степени надежность) полученного решения. На рисунке 3.32 представлен график определения принадлежности к группе для одного из решений.

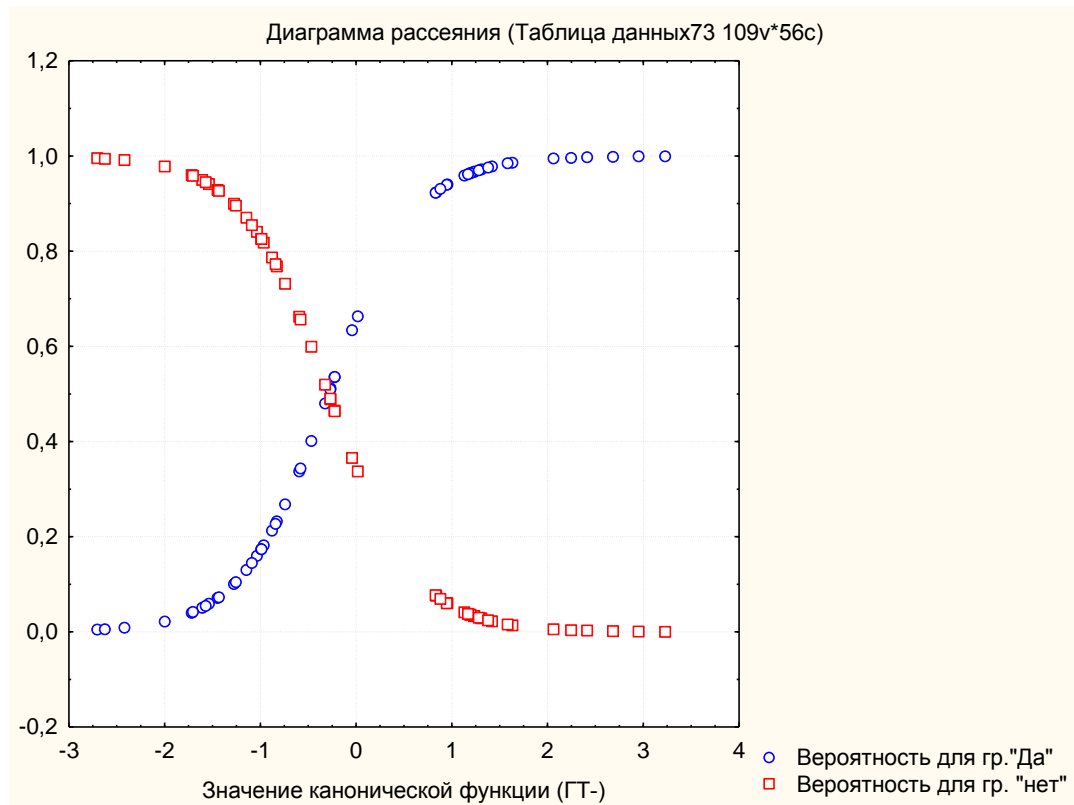


Рисунок 3.32 — Канонические функция вероятности отнесения к группам «да» - рецидив есть и «нет» - рецидива нет, для пациенток с вариантом терапии: «хирургическое + ГТ».

На основании полученных вариантов решения предлагается следующий алгоритм использования полученных результатов для трех исследованных групп: группы только с ГТ, группы только с АПХТ и группы с комбинацией ГТ+ХТ (во всех группах на первом этапе было проведено хирургическое лечение и удалена первичная опухоль) (таблица 3.65).

Таблица 3.65 — Таблица оценки риска рецидива на основании молекулярно-генетических характеристик ткани РМЖ.

Индекс рецидива (вероятность принадлежности к группе на основании значения канонической функции)	Интерпретация		
	Схема терапии (хирургическое +)		
	АПХТ	ГТ	ГТ+АПХТ
<40	Низкий	Низкий	Низкий
40-60	Средний	Средний	Средний
>60	Высокий	Высокий	Высокий

Таким образом, применение предложенной модели имеет следующий алгоритм. В образце ткани РМЖ конкретной пациентки анализируется уровень экспрессии генов. На основании полученных значений находится решение для трех вариантов лечения: только с адъювантной ГТ, группы только с АПХТ и группы с комбинацией ГТ+АПХТ. Наименьшее значение риска рецидивирования, полученное во всех вариантах решения является рекомендацией для выбора данной схемы лечения. Например: если получен «низкий» риск рецидивирования для всех возможных вариантов лечения, то для этой опухоли можно ограничиться только проведением адъювантной гормонотерапии. Если, «например», при решении трех уравнений получен высокий риск для группы «ГТ» и низкий риск для группы «ГТ+АПХТ», то это является рекомендацией использования АПХТ для этой пациентки.

Таким образом, разработанная модель оценки риска рецидивирования для пациенток РМЖ со стадией T1-2, N0-1, может оценить риск, в зависимости от вариантов планируемой терапии и выбрать оптимальную схему лечения.

3.5.7 Разработка математической модели определения риска локо-регионального рецидивирования (ЛРР) у пациенток с РМЖ при радикальной резекции

В связи с общей тенденцией увеличения доли ранних стадий в группе впервые выявленных РМЖ увеличивается количество пациентов, которым может быть показано органосохраняющее лечение. В тоже время, критерии, объективизирующие программы лечения для таких пациентов остаются до конца

не ясными, т.к. даже при отсутствии локального распространения и малого размера опухоли часть из них могут иметь неблагоприятный прогноз связанный с неблагоприятным молекулярным фенотипом. Поэтому, разработка дополнительных критериев выявления факторов неблагоприятного прогноза в группе пациенток, которым показано органосохраняющее лечения является актуальным. Поэтому следующим этапом исследования являлось исследование возможности применения разработанных нами алгоритмов прогноза рецидивирования конкретно для решения этой задачи.

Для решение этой задачи была выделена подгруппа пациенток, которая включала 98 больных раком молочной железы перенесших органосохраняющее лечение в виде радикальных резекций, квадрантэктомий, широких секторальных резекций с подмышечной лимфаденэктомией. Основную группу составили 33 пациентки, у которых в отдаленном послеоперационном периоде отмечено возникновение локорегионарного рецидива. Группу сравнения составили 65 пациенток с длительностью ремиссии более 5 лет. В исследование не включались пациентки, перенесшие неоадьювантную химиотерапию.

Возраст пациенток в исследовании варьировался от 25 до 72 лет, среднее значение для выборки составило $49,8 \pm 0,93$ лет. Средний возраст в группах прогрессирования и ремиссии составил $50,8 \pm 1,59$ и $49,2 \pm 1,15$ лет, соответственно.

В таблице 3.66 показано распределение пациенто по стадиям в этой исследованной группе.

Таблица 3.66 — Распределение пациентов по клиническим стадиям.

Исход \ Стадия	I (n=46)	IIa (n=33)	IIb (n=5)	IIIa (n=11)	IIIc (n=3)	Всего (n=98)
Ремиссия	40	19	1	5	0	65
Прогрессирование	6	14	4	6	3	33

На рисунке 3.33 показана частота возникновения рецидивов в зависимости от времени после терапии.

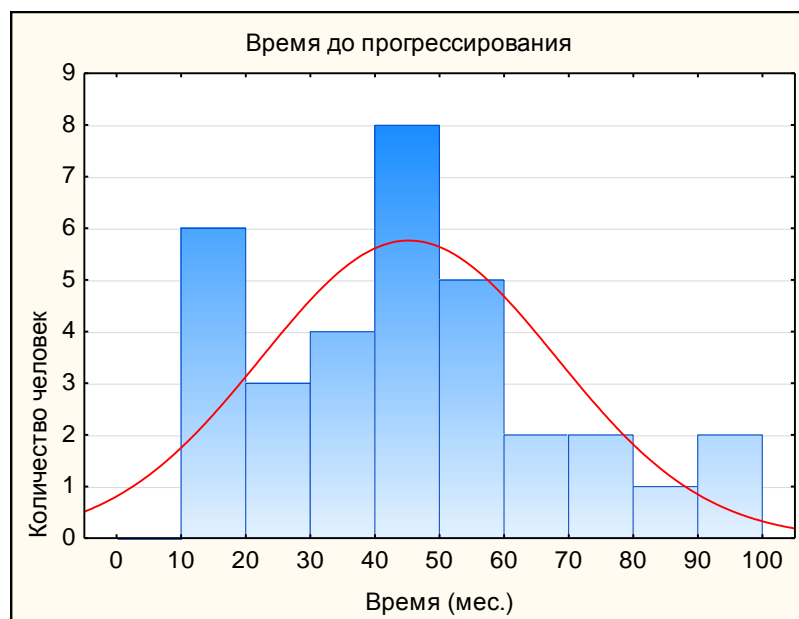


Рисунок 3.33 — Распределение пациентов по времени возникновения рецидивов.

Распределение пациентов по времени возникновения рецидивов показано на рис.5. При этом определяются 2 пика рецидивирования – первый пик от 10 до 20 месяцев, второй пик 40-60 месяцев. Среднее время до прогрессирования составило $45,2 \pm 3,9$ мес. Длительность наблюдения в группе ремиссии составило $79,3 \pm 2,3$ мес.

Морфологически опухоли были представлены протоковым, дольковым, смешанным и редкими формами рака (папиллярный, нейроэндокринный, рак в кисте и др.).

В группе пациентов с локорегионарными рецидивами протоковый рак наблюдался у 26 пациентов (79% от общего числа), дольковый рак у 5 пациентов (15%), в 2 случаях наблюдались смешанные формы рака (6%).

В группе ремиссии протоковый рак выявлен у 48 пациентов (74%), дольковый у 7 (11%), в 4-х случаях отмечено развитие смешанных опухолей (6%), по 2 случая появления рака в кисте (3%) и папиллярного рака (3%), по 1 случаю плоскоклеточного (1,5 %) и нейроэндокринного рака (1,5 %).

Мы провели дисперсионный анализ в группах (группы рецидивирования и группа благоприятного прогноза) для выявления потенциальных факторов, влияющих на развитие локорегионарных рецидивов. Были включены клинко-морфологические данные (возраст пациенток, размеры опухоли, наличие поражения регионарных лимфоузлов, стадия, количество пораженных л/у, соотношение рецепторов эстрогена и прогестерона) и логарифмы значений уровня экспрессии 21 гена. В дисперсионном анализе оценивается внутригрупповая и межгрупповая изменчивость признаков. С этой целью определяется сумма квадратов отклонений и F-критерий Фишера для групп прогрессирования и ремиссии (таблица 3.67).

Таблица 3.67 — Дисперсионный анализ клинических и генетических параметров опухоли

Критерии	Показатели	Сумма квадратов	F-критерий	P
	T	3,89	22,64	0,00
	N	6,39	10,56	0,001
	Стадия	2906,28	25,58	0,00
	MTC лимфоузлы	56,79	9,42	0,002
	KI67	28,86	9,13	0,003
	STK15	18,08	5,71	0,02
	MYC	12,3	4,69	0,03
	BAG1	14,11	11,19	0,001
	ESR1	28,27	3,40	0,07
	PGR	41,12	5,92	0,02
	CTSL2	23,51	7,58	0,01
	CD68	6,66	8,02	0,01

Как видно из приведенной таблицы статистические достоверные изменения ($p < 0,05$) наблюдались для всех морфологических критериев, а также следующих генов Ki-67, STK-15, MYC, BAG1, PGR, STCL2 и CD68.

Наличие большой группы параметров, достоверно отличающихся в группе прогрессирования по сравнению с группой, у которой за время наблюдения ЛРР не развивались, позволило предположить, что на их основе возможно создание математической модели прогноза. Для решения задачи поиска математической модели, для выделения группы с высоким риском рецидивирования использовали

тот же математический подход – дискриминантный анализ данных анализа уровня экспрессии комплекса генов в ткани РМЖ. Были определены значения дискриминантной функции в группах прогрессирования и ремиссии, а также определены коэффициенты дискриминантной функции для всех исследуемых параметров. Так, среднее значение дискриминантной функции для группы прогрессирования составило $-2,3$; для группы ремиссии $1,37$. На представленных рисунках 3.34 и 3.35 отражено распределение пациентов согласно полученным данным дискриминантной функции.



Рисунок 3.34 — Распределение значений дискриминантной функции в группе прогрессирования.



Рисунок 3.35 — Распределение значений дискриминантной функции в группе ремиссии.

Матрица классификации, полученная на основании полученного решения представлена в таблице 3.68. Полученное решение позволяет правильно предсказать появление локорегионарного рецидива в 95% случаев, и в 97% случаев правильно предсказывает его отсутствие.

Таблица 3.68 — Матрица классификации наличия-отсутствия локорегионального рецидива при радикальной резекции РМЖ на основании анализа уровня экспрессии генов в ткани опухоли (дискриминантный анализ).

Прогностические данные \ Клинические группы	Прогноз локорегионарного рецидива (кол-во чел.)	Прогноз ремиссии (кол-во чел.)	Процент
ЛРР	21	1	95%
Ремиссия	1	36	97%
Общее количество	22	37	100%

Учитывая тот факт, что классификация TNM обладает высокими предиктивными возможностями и в настоящее время является определяющей при выборе тактики хирургического лечения, был проведен дискриминантный анализ с использованием только 2-х параметров - размера опухоли и поражения регионарных лимфатических узлов. Прогноз развития ЛРР был правильно определен лишь в 63,6 % случаев, прогноз длительной ремиссии - в 84,6 % случаев. Использование комбинации клинических и ИГХ данных увеличивают вероятность верного прогноза в группе ремиссии до 87%, однако обладают такой же низкой чувствительностью по отношению к ЛРР. Изолированное, без использования клинических и ИГХ данных, применение 24-генной сигнатуры правильно определяет риск развития ЛРР в 77,7% случаев, выявляет пациенток из группы ремиссии в 95 % случаев. Объединяя данные клинического исследования с результатами ИГХ и молекулярно-генетических исследований вероятность выявления ЛРР возрастает до 95%.

Алгоритм применения полученных методов прогноза в общем виде выглядит так: после проведения хирургического этапа лечения (или после получения биопийного материала на этапе постановки диагноза) и получения

гистологических парафиновых блоков, параллельно при подготовки срезов для ИГХ исследования 2 среза отдаются на молекулярно-генетическое исследование для измерения экспрессии генов (проведение измерения экспрессии генов в парафиновых срезах опухоли подробно описано в разделе Материалы и методы); после получения измерения уровней экспрессии необходимого набора генов, их значения подставляются в формулу для вычисления дискриминантной функции.

Значение дискриминантной функции = $4,1 + T*(-2,25) + ESR1%*(-0,03) + PGR%*(0.007) + Cerb-b2*(-0.074) + MYBL2*(0.23) + BAG1*(0.69) + MMP11*(-0.15) + CTSL2*(-0.32)$

Где - 4,1 – значение константы;

T – размеры опухоли по системе TNM(от 1 до 2);

ESR1% - относительное количество рецепторов эстрогена, выраженное в процентах;

PGR% - относительное количество рецепторов прогестерона, выраженное в процентах;

Cerb-b2 – уровень белка Cerb-b2 (значения от +1 до +3);

MYBL2, BAG1, MMP11, CTSL2 – экспрессия соответствующих генов, выраженная в условных единицах.

Полученное значение сравнивается со средними значениями пациентов из группы ремиссии (1,05) и группы прогрессирования (-1,77). Чем ближе полученное значение к результатам средних значений, тем достовернее отражает результат прогнозирования. Значения функции от -0,4 до 0 являются промежуточными, мы рекомендуем расценивать их как группу высокого риска прогрессирования.

На основании полученных значений канонических функций определяется принадлежность к группе высокого или низкого риска рецидивирования (группы Да и Нет при проведении ретроспективного анализа). Если получен высокий риск рецидивирования, то больно рекомендуется мастэктомия, а если экономная резекция уже проведена (т.е. исследование проведено в после операционном материале), то больной рекомендуется расширение объема хирургического лечения.

Суммируя приведенные в этом разделе работы результаты можно констатировать, что использование многомерных методов анализа профиля экспрессии генов в ткани опухоли позволяет получить эффективные модели прогноза как отдаленного, так и местного рецидивирования при РМЖ.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

4.1 Место молекулярно-генетического метода в комплексной диагностике РМЖ

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) рак молочной железы (РМЖ) является одним из наиболее распространенных заболеваний в женской популяции, насчитывая более 16% от всех онкологических заболеваний, ежегодная смертность от которого превышает пятьсот тысяч (Coleman M.P., 2008, Danaei G., 2005). Выживаемость при РМЖ значительно отличается в разных странах и находится в прямой зависимости от уровня экономического развития, составляя около 80% в США и Швеции, и снижаясь до 40-60% в развивающихся странах. В значительной степени на качество жизни больных влияют как само заболевание, так проводимая терапия. Данные показатели свидетельствуют о большом клиническом и экономическом значении РМЖ для общественного здравоохранения. Поэтому, разработка новых методов диагностики и лечения РМЖ является актуальной задачей. При этом, важное значение имеют методы, направленные на профилактику и на «вторичную профилактику», т.е на раннее выявление заболевания, что резко повышает выживаемость пациентов и снижает стоимость лечения (Семиглазов В.Ф., 2012). Методы скрининга РМЖ вошли в практику здравоохранения в ряде стран мира и активно развиваются в Российской Федерации (Солодкий В.А.,2012, Рожкова Н.И.,2014).

В настоящее время в России в 75% случаев РМЖ выявляется больной самостоятельно, в 7% — при врачебном осмотре и только в 18% — при маммографическом профилактическом исследовании. Выявляемость заболевания в ходе профилактических осмотров в целом по стране остается низкой, и не превышает 18%, а показатель запущенности (больные III и IV стадиями), который является ведущим критерием качества диагностики, напротив, высоким — около 40%. Это одна из главных причин высоких показателей смертности от РМЖ: летальность на первом году с момента установления диагноза выше 12 % (Каприн А.Д., 2016).

В настоящее время существует большое количество методов диагностики заболеваний молочных желез, каждый из которых имеет как определенные преимущества, так и ряд ограничений. Отличительной особенностью современных технологий является широкое внедрение методик интервенционной радиологии, среди которых особое место занимают малоинвазивные вмешательства, выполняемые под рентгенологическим и сонографическим контролем (Каприн А.Д., Рожкова Н.И., 2016).

В тоже время, алгоритм обследования пациенток с не проявляющимися клинически образованиями молочной железы на дооперационном этапе четко не определен. Основным методом получения материала для морфологического исследования является пункция, в том числе тонкоигольная аспирационная биопсия при заболеваниях молочной железы. Данные процедуры, будучи щадящими, в ряде случаев оказываются малоинформативными, вследствие чего возникает необходимость проведения дополнительных процедур для получения достаточного количества материала для цитологической или гистологической верификации диагноза.

Современная диагностика заболеваний молочной железы основывается на комплексном обследовании, включающем клинический, рентгенологический, цитологический методы. Каждый из них имеет различную информативную ценность (при клиническом обследовании – 50–68%, при рентгенологическом и цитологическом исследованиях – 87–92%). Диагноз «узловая мастопатия» по результатам клинико-рентгенологического исследования устанавливается у 8–16,5% исследованных больных. Однако мнения специалистов относительно направлений для увеличения информативности методов диагностики достаточно противоречивы. Развитие маммографии в последнее время позволило значительно повысить эффективность дооперационной дифференциальной диагностики заболеваний молочных желез. Использование маммографии увеличило диагностику рака молочной железы в доклинических, непальпируемых стадиях с 9,5% до 24,6%, а в преинвазивной стадии с 0,8-5% до 8–20%. (Солодкий В.А., 2015). Широкое распространение маммографического скрининга в ряде стран

изменило соотношение опережаемых доброкачественных и злокачественных опухолей молочной железы. В связи с этим стали разрабатываться органосохраняющие хирургические методы лечения. Это обусловило необходимость уточненной морфологической диагностики данных новообразований на дооперационном этапе, поскольку лечебная тактика существенно варьирует в зависимости от характера процесса.

Использование современных методов молекулярно-биологического исследования образца ткани на дооперационном этапе при заболеваниях молочной железы значительно расширяет возможности в плане быстрой и точной верификации диагноза и существенным образом влияет на выбор и тактику комбинированного и комплексного лечения онкологического заболевания. Активно развивающиеся в настоящее время молекулярно-генетические методы анализа обладают рядом преимуществ перед морфологическими методами исследования и включены в современную классификацию РМЖ (Tavassoéli F.A., 2003) Это касается, прежде всего, возможности стандартизации метода, независимости от экспертного мнения и меньшей чувствительности к качеству получаемого материала (по сравнению с морфологическими методами).

Увеличенная частота выявления неинвазивного РМЖ (карциномы *in situ*) вызывает постоянные дебаты об оптимальном лечении таких «начальных» форм рака, так как обнаружение рака (или его предшественников) до клинического проявления повышает риск ложноположительной диагностики и избыточного лечения. Весьма распространенное мнение о том, что эпителиальная опухоль молочной железы неизбежно прогрессирует от атипии к карциноме *in situ*, далее к инвазивному раку и последующему метастазированию, поддерживается далеко не всеми исследователями. Поскольку скрининговая маммография в отличие от клинического метода (пальпации) позволяет рано выявить разнообразную патологию молочной железы, становится особенно важным знать больше о риске прогрессии различных видов и форм идентифицированной патологии. Понимание угрозы и частоты прогрессии этой патологии критически важно при проведении

программы скрининга, включая и выбор адекватного лечения выявленного заболевания (В.И. Чиссов, 2009).

Основная проблема дифференциальной диагностики заключается в том, что не только клинически, но даже рентгенологически и сонографически, узловатая мастопатия имеет сходные проявления, как с доброкачественными, так и со злокачественными заболеваниями молочной железы (Запирова, С.Б., 2005).

По данным статистики США, из 1000 женщин, прошедших процедуру маммографического скрининга, дополнительные диагностические мероприятия были назначены для 7% обследованных, из них меньшая часть получает направление на биопсию, а у большей (до 80%) устанавливается доброкачественный характер патологии (Coleman M.P., 2008). Таким образом, биопсия для уточнения диагноза проводится у 15% пациентов с подозрением на рак по результатам клинико-рентгено-сонографического обследования. Группа этих пациентов может быть расширена до 20-30% за счет проведения щадящей биопсии и высокоточного молекулярно-биологического исследования вместо тщательного наблюдения в группе среди пациентов, у которых в ходе клинико-рентгено-сонографического был установлен доброкачественный характер опухоли.

В связи этими диагностическими проблемами, метод дифференциальной диагностики доброкачественных заболеваний (ФА, в частности) и РМЖ на основании молекулярно-биологического исследования биопсийного материала диагностического алгоритма, включающего этот метод, позволяет решить часть проблем и существенно повысить информативность диагностического процесса.

Предлагаемый в настоящей работе интегральный метод позволяет производить дифференциальную диагностику РМЖ с более высокой эффективностью (96%) при сопоставимой стоимости.

Включение молекулярно-биологических исследований в алгоритм клинико-рентгенологического обследования позволит использовать данный метод диагностики в системе с программой национального скрининга, что существенно повысит ее эффективность.

В первом фрагменте нашего исследования мы провели анализ закономерностей изменения экспрессии генов при различных патологических процессах в ткани молочной железы для установления биологической основы для развития морфологических проявлений заболевания.

Было показано, что отличия экспрессии генов пролиферации (KI67, STK15, CCNB1) в различных типах ткани свидетельствуют об увеличении пролиферативной активности в доброкачественных и злокачественных новообразованиях по сравнению с морфологически неизменной тканью. В этом отношении полученные результаты соответствуют данным мировой литературы. По данным Magloire Ketcha Wanda G.J. (2011), экспрессия KI67 повышается не только в образцах злокачественной опухоли, но и продолжает увеличиваться при прогрессировании заболевания, в частности, при лимфогенном распространении злокачественных клеток. В нашем исследовании достоверные отличия экспрессии *KI67* были получены при сравнении образцов неизменной ткани и рака молочной железы, а также внутри группы рака молочной железы в зависимости от наличия метастатических лимфоузлов (сравнение групп N0 - N2) и гистологического типа опухоли. Связь экспрессии KI67 с пролиферативной активностью клетки описана более двадцати лет назад (Schor S., 2001), но функции гена до сих пор не выяснены. Естественно, без понимания функции невозможно выделить признак, на который следовало бы ориентироваться при формировании групп для сравнительного анализа экспрессии.

Повышение экспрессии KI67 и CCNB1 (циклин В) отражает повышение пролиферативной активности клеток не только при развитии злокачественного заболевания, но и прогрессировании уже существующей опухоли (Хуе, К.Х., 2005). Этим фактом объясняется продолжающееся повышение экспрессии указанных генов при увеличении размера опухоли, стадии заболевания, в опухолях различной степени злокачественности (характерно так же для STK15). К таким выводам пришел Li V.J., 2014, описавший изменение экспрессии KI67 и CCNB1 при раке молочной железы в зависимости от различных морфологических особенностей опухоли. По данным Chae S.W. (2011) экспрессия CCNB1

коррелирует со степенью злокачественности опухоли. Согласно полученным нами результатам, экспрессия циклина В коррелирует с размером опухоли, лимфогенной распространенностью (отличия в группах N0 и N2) и стадией заболевания, гистологическим типом, а также степенью злокачественности, отражая прогрессирование заболевания.

В целом, для генов кластера пролиферации была характерна высокая положительная корреляция экспрессии по отношению друг к другу. Вероятным объяснением этого результата может быть очевидное наличие функциональной связи между этими генами и параллельное повышение их активности в одной фазе клеточного цикла, что описано для CCNB1 и STK15 (Toru Hirota, 2003), играющих важную роль при запуске механизмов активации фазы митоза. Дополнительным фактом, подтверждающим то, что корреляция экспрессии этих генов является следствием одновременной их активации, является существование корреляции экспрессии обоих генов с ингибитором апоптоза BIRC5, максимальная функциональная активность которого также описана в G2/M фазе клеточного цикла (Wagner P., 2005). Кроме того, механизм действия описанных обоих генов пролиферации тесно связан с контролем формирования веретена деления. Таким образом, вероятно, высокий уровень экспрессии трех генов (STK15, CCNB1, BIRC5) косвенно определяет количество клеток в фазе G2/M клеточного цикла, то есть пул с максимальной пролиферативной активностью, чем и объясняется одновременное повышение их экспрессии при прогрессировании злокачественного заболевания.

В отличие от описанных выше генов KI 67, CCNB1, STK15, для которых характерна положительная корреляция с пролиферацией, динамика изменения экспрессии опухолевого супрессора PTEN обратно пропорциональна изменению пролиферативной активности. Функционально это объясняется инактивирующим влиянием кодируемого геном белка на один из важнейших пролиферативных сигнальных каскадов PI3K/Akt (Chu E.C., 2004), что справедливо и для клеток рака молочной железы (De Graffenried L.A., 2004). При этом отмечена обратная корреляция экспрессии PTEN со стадией заболевания, степенью

злокачественности, лимфогенным распространением опухоли (Depowski P.L., 2005). Karpes H. (2001) описал корреляцию экспрессии PTEN в опухоли с экспрессией рецепторов эстрогена и, в меньшей степени, прогестерона. В проведенном исследовании экспрессия PTEN обратно пропорционально коррелировала с типом ткани, достигая минимальных значений при раке молочной железы, а также размером опухоли, стадией заболевания и степенью злокачественности, снижаясь при увеличении значений этих морфологических критериев. Эти результаты не противоречат ни данным литературы, ни логике прогрессирования злокачественного заболевания. Изменения экспрессии в зависимости от статуса рецепторов стероидных гормонов, описанное Karpes H. 2001, не отмечено.

В целом, изменение экспрессии генов кластера пролиферации при прогрессировании злокачественного заболевания, описанное в исследовании, вполне соответствует логике опухолевой прогрессии: повышение активности генов, стимулирующих пролиферацию (KI 67, CCNB1, STK15) на фоне снижения активности ингибитора пролиферации PTEN.

Иная динамика изменений была свойственна экспрессии генов контроля апоптоза. Изменение экспрессии ингибитора апоптоза BIRC5 при раке молочной железы описано рядом авторов (Aziza N., 2008, Ryan B.M., 2006). Отмечается повышение экспрессии этого гена в клетках злокачественной опухоли, а также корреляция экспрессии BIRC5 со степенью злокачественности опухоли, стадией заболевания и отрицательным статусом рецепторов стероидных гормонов, что также отмечено в нашем исследовании. Повышение экспрессии BIRC5, как ингибитора апоптоза, в процессе прогрессии опухоли представляется вполне закономерным, однако механизмы этого процесса до настоящего времени неизвестны. H. Asanuma, 2005, предположил участие рецепторов IGF и HER2/neu в контроле повышения экспрессии гена BIRC5, оба этих рецептора влияют на экспрессию BIRC5 путем активации внутриклеточных пролиферативных каскадов, в частности PI3K/АКТ. В нашем исследовании была отмечена положительная и статистически значимая корреляция между экспрессией мРНК

BIRC5 и HER2/neu в морфологически неизменной ткани молочной железы, что вполне соответствует предложенной Hiroko Asanuma концепции. Кроме того, участие пролиферативного каскада PI3K/АКТ в положительной регуляции BIRC5 может быть одним из возможных объяснений отрицательной и статистически значимой корреляции между экспрессией гена BIRC5 и PTEN, ингибитора этого пролиферативного каскада, наблюдаемого в проведенном исследовании как в морфологически неизменной ткани, так и при раке молочной железы. Снижение экспрессии проапоптотического гена NDRG1 (p53-зависимого активатора каспаз), участвующего в активации механизмов апоптоза, описано для ряда злокачественных опухолей, его высокая экспрессия является независимым фактором благоприятного прогноза (Nagai M.A., 2011). С другой стороны Мао Х.У. (2011), описал изменение экспрессии белка NDRG1 как независимый маркер инвазивного рака молочной железы, обнаружив достоверное повышение его экспрессии в образцах злокачественных опухолей по сравнению с гиперплазией и раком *in situ*. Однако в нашем исследовании в образцах рака молочной железы экспрессия гена NDRG1 была снижена по сравнению с морфологически неизменной тканью, корреляции с клинико-морфологическими характеристиками опухоли обнаружено не было. Также следует отметить, что в кластере генов апоптоза NDRG1 был единственным геном, для которого отмечено исчезновение в клетках рака молочной железы практически всех корреляции с экспрессией других генов, наблюдаемой для морфологически неизменной ткани. Вероятно, данный результат, наряду со снижением экспрессии в злокачественных опухолях, а также, принимая во внимание проапоптотические свойства гена, можно объяснить подавлением активности гена в процессе опухолевой прогрессии.

Для экспрессии генов, условно определенных в кластер клеточной дифференцировки и кодирующих в основном клеточные рецепторы (рецептор эстрогена, прогестерона, HER2/neu и его коактиватор GRB7), а также маммаглобин, белок, экспрессия которого наблюдается при высоко дифференцированном раке молочной железы (Zehentner B.K., 2004) повышение

экспрессии гена рецептора эстрогена отмечено для рака молочной железы. G. Barr (2011) описал повышение экспрессии рецепторов эстрогена в ткани протоковой гиперплазии, атипичной протоковой гиперплазии и при раке молочной железы, при этом наблюдалось последовательное увеличение экспрессии гена при прогрессировании заболевания. В нашем исследовании экспрессия гена ESR была достоверно выше в ткани рака молочной железы по сравнению с морфологически неизменной тканью, а также положительно и сильно коррелировала с экспрессией прогестерона и результатами иммуногистохимического исследования экспрессии белка рецептора эстрогена. Достоверных отличий при сравнении относительно клинико-морфологических характеристик опухоли для экспрессии ESR не обнаружено, за исключением значительного снижения в опухолях низкой степени злокачественности (G3), что также описано и у других авторов (Pathak T.V., 2000). При сравнении экспрессии генов в образцах рака молочной железы в зависимости от экспрессии рецепторов эстрогена по данным ИГХ, в случае PЭ+ рака молочной железы экспрессия гена ингибитора апоптоза BCL2, проапоптотического NDRG1 и протеолитического CTSL2, а также ESR и PGR была выше. Авторы работы (Sofia G., 2001) описали отличия экспрессии генов в зависимости от статуса рецепторов эстрогена в опухоли, выделив группу из 50 генов с различным уровнем экспрессии, в которую, в частности, входил и NDRG1. Также следует отметить, что в опухолях, экспрессирующих рецепторы прогестерона, экспрессия NDRG1 также была выше по сравнению с прогестерон-отрицательными опухолями. Делать вывод о том, что благоприятный клинический прогноз в случае положительного статуса рецепторов стероидных гормонов опухоли, каким-то образом связан с повышенной экспрессией проапоптотического активатора каспаз в ткани опухоли, в настоящее время достаточных оснований нет, однако выявленная закономерность экспрессии NDRG1, безусловно, заслуживает внимания.

В последнем, исследованном в работе кластере генов межклеточных взаимодействий, экспрессия гена, кодирующего матриксную металлопротеиназу (MMP11), была повышена в ткани рака молочной железы, а также наблюдалась

тенденция повышения экспрессии при более высоком метастатическом потенциале РМЖ. Эти результаты согласуются с данными литературы, MMP11 считается маркером свойств инвазивности и метастатического потенциала злокачественной опухоли (Cheng C.W., 2010).

Несколько интересных наблюдений было отмечено при анализе экспрессии генов в образцах морфологически неизменной ткани (Козлов В.В., 2014). На наш взгляд интерпретация полученных результатов в первую очередь интересна с позиций взаимодействия опухоли с окружающим матриксом. Существование подобного рода взаимодействий является известным фактом, однако закономерности этого процесс неизвестны (Coussens L., 2001, Radisky D., 2001, Schor S., 2001). В проведенной работе были обнаружены достоверные отличия экспрессии генов в неизменной ткани при сравнении таких фенотипических характеристик опухоли как статус рецепторов стероидных гормонов и HER2/neu.

Проведенная оценка уровня экспрессии мРНК генов ответственных за процессы пролиферации, апоптоза, межклеточного взаимодействия и клеточной дифференцировки в ткани молочной железы при раке и фиброаденоме позволила выявить наиболее значимые дифференциальные молекулярно-генетические маркеры заболеваний молочной железы. Так, в тканях при злокачественной трансформации увеличивается уровень экспрессии генов, ответственных за процессы пролиферации (Ki67, Aurca, CCNB1, GRB7), увеличивается уровень экспрессии проапоптотического гена BIRC5 и снижается уровень супрессоров апоптоза BCL2, NDRG1, значимо изменяется уровень экспрессии MGB1.

При анализе результатов, с использованием различных методов статистической обработки, и на основании полученных достоверных отличий в уровне экспрессии генов, для дифференциальной диагностики РМЖ и ФА, следует определять уровень экспрессии генов: Ki67, Aurca, BIRC5, CCNB1, MMP11, BCL2, NDRG1, MGB1. Эти же гены можно использовать для исключения/подтверждения диагноза РМЖ (уровень экспрессии достоверно отличается от уровня экспрессии в неизменной ткани) и оценивать прогноз течения заболеваний молочной железы.

Интересные результаты были получены нами при исследовании уровня экспрессии мРНК маммаглобина (MGB1) в нормальной ткани молочной железы, в ткани фиброаденомы молочной железы и в ткани рака молочной железы, которые показали, что при раке молочной железы достоверно повышается уровень экспрессии мРНК маммаглобина. При фиброаденоме уровень экспрессии мРНК маммаглобина по сравнению с группой РМЖ снижен в 2 раза. Полученные нами данные находятся в соответствии с данными литературы (Watson M.A. 1996).

Проведенный анализ связи уровня экспрессии мРНК маммаглобина с гистологической принадлежностью (фиброаденома или рак молочной железы) достоверных различий не выявил. Данных об изучении этого показателя и экспрессией маммаглобина в литературе нами обнаружено не было. Следует отметить, что опухоли меньшего размера имели более высокий уровень экспрессии маммаглобина, а также опухоли с N0 и N1 имели достоверно более высокие уровни экспрессии мРНК маммаглобина (N по классификации TNM). Таким образом, чем более агрессивный фенотип опухоли, выше ее потенциал к метастазированию, тем уровень маммаглобина ниже. Анализ связи уровня экспрессии мРНК маммаглобина со степенью злокачественности опухоли при РМЖ, определяемой по гистологической структуре ткани показал, что G1-G2 степень злокачественности практически не отличаются по уровню экспрессии мРНК маммаглобина, но в группе с третьей степенью злокачественности G3, уровень экспрессии резко снижается и отличается почти в 10 раз от группы со степенью злокачественности G1. Полученные результаты показывают, что для ранних стадий РМЖ T1-2, N0-1 характерен достоверно более высокий уровень маммаглобина. По данным литературы, существует прямая зависимость между уровнем экспрессии рецепторов эстрогена (РЭ) и уровнем экспрессии мРНК маммаглобина, т.е чем выше экспрессия маммаглобина тем выше экспрессия РЭ (Span P.N., 2005). В проведенной работе такая закономерность так же подтверждена, средний уровень экспрессии мРНК маммаглобина в группах РЭ положительных и РЭ отрицательных отличается в 2 раза. Похожая зависимость наблюдается и при анализе уровня экспрессии мРНК маммаглобина с уровнем

рецепторов прогестерона. Чем выше экспрессия рецепторов прогестерона, тем выше уровень экспрессии маммаглобина. Таким образом, увеличение экспрессии мРНК маммаглобина достоверно повышается на ранних стадиях развития рака молочной железы и может быть дополнительным дифференциально-диагностическим критерием гиперпластических процессов. В тоже время, увеличение степени злокачественности опухоли (гистологическая классификация, увеличение метастатического потенциала) сопровождается относительным снижением уровня экспрессии мРНК маммаглобина в ткани РМЖ и может служить дополнительным критерием прогноза при РМЖ.

Эти результаты могут являться основанием для исследования уровня экспрессии (и особенно его обнаружения в периферической крови) как диагностического маркера РМЖ, т.к., в настоящее время, именно для ранних стадий практически нет значимых онкомаркеров. Анализ полученных в работе данных включал результаты комплекса клинико-рентгено-сонографических обследования пациенток с гиперпролиферативными образованиями молочной железы и результаты молекулярно-биологического анализа, включающего определение уровня экспрессии мРНК комплекса генов. Всем пациенткам была проведена маммография, по результатам которой была оценена структура молочной железы, наличие узловых образований, их структуру и форму, а также наличие кальцинатов в ткани железы, проведено УЗИ исследование молочных желез, на котором была оценена эхогенность узла, его форма и наличие аномального кровотока в зоне узлового образования.

Был проведен сравнительный анализ экспрессии исследуемых генов, в частности мРНК маммаглобина, и данных клинико-радиологических методов исследования молочной желез. Стоит отметить, что в доступной литературе нам не встретились работы, в которых рассматривалась связь показателей современных радиологических методов визуализации и молекулярно-генетических характеристик ткани молочной железы. При клиническом обследовании пациенток пальпируемое образование было выявлено у 77,2 % обследованных. Достоверных отличий между уровнем экспрессии мРНК маммаглобина и

наличием пальпируемого образования не было выявлено не в группе больных РМЖ, ни в группе больных с фиброаденомой молочной железы. Зависимости с уровня экспрессии мРНК маммаглобина и усиление кровотока при РМЖ, определенное методом доплерографии, показано не было. Таким образом, можно сделать вывод, что данный показатель является важным независимым диагностическим маркером.

Для группы пациенток с фиброаденомой молочной железы получено, что, при наличие диффузных изменений (ФКМ, ФЖИ) в ткани железы отмечается повышенный уровень экспрессии мРНК маммаглобина. Так же установлена закономерность что, чем более выражена фиброзно-кистозная мастопатия, тем выше уровни экспрессии мРНК маммаглобина. Следует учитывать, что выраженная фиброзно-кистозная мастопатия, входящая в зону риска по развитию РМЖ, в сочетании с высокими цифрами экспрессии мРНК маммаглобина является настораживающим фактором, требующим более детального обследования.

Среди 54 обследованных женщин с фиброаденомой молочной железы у 5 пациенток на маммографическом снимке были обнаружены не характерные для доброкачественного процесса признаки узлового образования (неровные полициклические контуры) и в этой группе больных был отмечен повышенный (более чем в 3 раза) уровень экспрессии мРНК маммаглобина. Следовательно, можно предположить, что группа данных пациенток, возможно, имеет повышенный риск развития РМЖ.

Данные маммографического обследования и уровень экспрессии мРНК маммаглобина были проанализированы и для группы больных РМЖ. В данной группе значимых изменений в экспрессии мРНК маммаглобина при анализе диффузных изменений в ткани железы и структуре узлового образования нами обнаружено не было. Наличие микрокальцинатов в опухоли является более неблагоприятным признаком, по сравнению с наличием макрокальцинатов. При анализе уровня экспрессии мРНК маммаглобина и наличием кальцинатов в ткани железы получена следующая закономерность, средний уровень экспрессии мРНК

маммаглобина в ткани опухоли у пациенток с микрокальцинатами был равен 97,45 отн.ед, у пациенток с макрокальцинатами - 425,08 отн.ед. (отличия более чем в 4 раза). Из литературы известно, что чем более агрессивный фенотип имеет опухоль, тем более низкий уровень экспрессии мРНК маммаглобина в ней определяется. Таким образом, полученные нами результаты не противоречат литературным данным (Watson M.A., 1999).

В работе так же изучена диагностическая информативность определения мРНК маммаглобина в крови пациенток с заболеваниями молочной железы. В результате установлено, что определение мРНК маммоглобина в периферической крови обладает чувствительностью – 60,6%, и специфичностью – 93,2% для диагностики РМЖ. Таким образом, исследование мРНК маммаглобина в крови может быть использовано, как для первичной диагностики, так и для мониторинга РМЖ.

4.2 Перспективы использования молекулярно-генетических технологий в диагностике и прогнозе заболеваний молочной железы

В проведенном исследовании показано, что применение молекулярно-генетических технологий для диагностики гиперпролиферативных изменений молочной железы целесообразно при получении неоднозначного цитологического заключения о характере процесса, отрицательных результатах повторного цитологического заключения в практике обследования пациенток с диспластическими изменениями молочной железы. Это важно как на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи, так и в практике работы специализированных отделений. В алгоритм обследования пациенток с неблагоприятными изменениями молочной железы необходимо включать анализ экспрессии мРНК Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP11, MGB1. При этом, в случае увеличения экспрессии мРНК одного и более генов из группы, включенных в молекулярно-биологический алгоритм для конкретной нозологической формы, больше критического значения, врачами клинической лабораторной диагностики/врачами-генетиками делается заключение о высокой

вероятности наличия злокачественного процесса и врачом онкологом назначается проведение биопсии, а в случае наличия операционного материала более тщательное его исследование врачом-патологоанатомом.

Разработанная технология углубленного обследования пациенток с гиперпролиферативными изменениями молочной железы с включением молекулярно-биологических методов исследования в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики гиперпролиферативной патологии молочной железы с 81 до 96%.

Экономический эффект внедрения обусловлен оптимизацией использования финансовых затрат на обследование и лечение пациенток с доброкачественными и злокачественными образованиями молочной железы при повышении качества оказания медицинской помощи.

Включение данного уточняющего способа диагностики на основе определения и сравнительной оценки уровней экспрессии мРНК генов возможно в практике работы врачей клинической лабораторной диагностики/врачей-генетиков клинико-диагностических, генетических лабораторий общей лечебной сети и специализированных учреждений онкологического профиля, оснащенных необходимым оборудованием для выполнения количественной ПЦР. Предложенный способ уточняющей диагностики заболеваний молочной железы уменьшает период времени, затраченный на постановку диагноза, пребывание пациента в стационаре, снижает риск неоправданных хирургических вмешательств вследствие ложно-положительных цитологических заключений о характере процесса.

На основании полученных результатов разработаны проекты методических рекомендаций «Методологические аспекты комплексной диагностики гиперпролиферативных заболеваний молочной железы» предназначенных для врачей клинической лабораторной диагностики, врачей-генетиков и врачей онкологов.

Предлагается внесение изменения в клинический стандарт обследования пациенток с предраковыми изменениями и злокачественными новообразованиями

молочной железы и внедрение предложенного способа диагностики в практику работы врачей учреждений онкологического профиля и общей лечебной сети.

Предусмотрена разработка, производство и внедрение в практику работы клиничко-диагностических лабораторий, учреждений онкологического профиля и общей лечебной сети, отечественных тест-систем на основе определения и комплексной оценки уровней экспрессии мРНК генов: Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP11, MGB1 с применением метода количественной ПЦР по биологическому материалу для уточняющей диагностики заболеваний молочной железы.

Таким образом, реальный сектор экономики получает несколько дополнительных направлений. Первое из них заключается в производстве диагностических наборов и их использовании в диагностическом алгоритме для выявления и дифференциальной диагностики патологий молочной железы. Стоимостная оценка производства (и количество таких наборов) необходимое для обеспечения диагностического процесса для патологии молочной железы может быть осуществлена следующим образом: в Российской Федерации в эту возрастную группу входят 17,5 млн. женщин, среди которых ежегодно выявляется 25 433 случая РМЖ. Учитывая, что интервал между раундами скрининга обычно равняется 2 годам, ежегодно будут приглашаться на скрининг 8 750 тыс. женщин, а фактически придут на обследование в лучшем случае 75% от числа приглашенных, т.е. 6 750 тыс. женщин. Подозрение на рак будет установлено в 7% обследований (472 500 женщин). При условии, что биопсия с проведением молекулярно-биологического исследования по предлагаемой методике будет назначено для 25% из них, а фактически по различным причинам она будет проведена только половине из них, то расчетная популяция пациентов составит около 60 тыс. женщин в год. Таким образом, при средней стоимости диагностического теста 5000 рублей, рыночный потенциал методики оценивается в 300 млн. рублей в год только для диагностики РМЖ.

Второе направление внедрения разработанных методов – реализация молекулярно-биологических исследований в клиничко-диагностических

лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Это потребует увеличения количества персонала и закупок дополнительного оборудования для проведения ПЦР исследований (при его отсутствии); учет затрат времени, необходимых на одно исследование, и потенциального количества исследований позволяет предположить, что внедрение данного метода может привести к дополнительному созданию порядка 1000 рабочих мест.

Полученные результаты в ходе проведенного исследования позволяют также сформулировать возможные направления для дальнейших научных и научно-практических исследований. Одно из них заключается в проведении поиска молекулярно-генетических маркеров для ранней диагностики и прогноза опухолей различных локализаций (рак яичников, рак кишечника, рак шейки матки, эндометрия и др.). Кроме того, полученные результаты по изменению уровня экспрессии генов не только в патологически измененной ткани, но и в окружающей ее, морфологически неизменной ткани органа позволяют сформулировать новые подходы к принципам диагностики гиперпролиферативной патологии. Новый алгоритм позволяет заменить полуколичественные иммуно-гистохимические методы оценки экспрессии дифференцировочных маркеров (рецепторов эстрагена и прогестерона) на количественные методы, основанные на ПЦР в реальном времени и получить более достоверные оценки злокачественного потенциала анализируемой ткани.

4.3 Гетерогенность ткани РМЖ и методы ее оценки

Популярность проблемы индивидуализации терапии, в частности при раке молочной железы, широко обсуждаемая в настоящее время в онкологическом сообществе, объясняется несколькими обстоятельствами. Во-первых, наличием безусловной клинической потребности в обоснованном выборе схемы комплексного лечения с учетом максимально благоприятного соотношения пользы и риска от проводимой терапии. Эта задача не является новой, так как используемые методы цитотоксической терапии сопровождаются одинаково неприятными для больного побочными эффектами, при различной и

непредсказуемой их индивидуальной эффективности. Вторым обстоятельством, но, вероятно, более важным, является появление возможности индивидуализации терапии с учетом не только морфологических характеристик, но и молекулярно-биологических характеристик, определяющих фенотип опухоли. И наконец, в качестве третьего обстоятельства, нельзя не сказать о появлении возможности таргетного воздействия на ключевые молекулярные механизмы канцерогенеза: пролиферации, апоптоза, ангиогенеза и др. с целью их ремоделирования (Rouzier R., 2005; Leroy, C., 2014; Green A.R., 2016).

Таким образом, повышенное внимание к проблеме индивидуализации терапии объясняется появлением новых возможностей диагностики и прогнозирования и дальнейшего лечения заболевания.

Основной задачей как уже существующих систем классификации и прогноза, в частности для рака молочной железы (TNM, adjuvant!online, NPI), так и создаваемых новых, в основе которых лежит определение и анализ молекулярно-биологических характеристик опухоли (молекулярно-биологическая классификация подтипов рака молочной железы, Oncotype DX, MammaPrint), является формирование групп больных на основе индивидуального анализа тех или иных морфологических или молекулярных признаков, определяющих показания к проведению стандартизированной терапии (Esteva FJ., 2003, Dabbs D.J., 2011, Dowsett M., 2001; Hornberger, J., 2011; Hugh, J., 2009; Mook, S., 2009). Появление новых маркеров, описывающих поведение опухоли не в русле таких грубых с точки зрения биологии клетки определений, как, например, изменение опухолевой массы или наличие некроза как оценка терапевтического патоморфоза, а способных дать оценку пролиферативной и апоптотической активности пула клеток, составляющих опухоль, безусловно, позволит повысить точность прогностических систем.

Поэтому, вероятно, проблема индивидуализации прогноза должна решаться в контексте индивидуализации фенотипической картины опухоли, чему обязательно должен предшествовать детальный анализ молекулярно-биологических механизмов, отличающих нормальную клетку от злокачественной.

Несмотря на то, что внедрение технологии определения молекулярных фенотипов РМЖ существенно оптимизировало алгоритм назначения различных программ лечения, ряд проблем остается нерешенным, и в первую очередь они связаны с оптимизацией назначения АПХТ при ранних стадиях РМЖ. После хирургического лечения для больных РМЖ I-II стадии в случае эстроген-позитивного и HER2-негативного фенотипа опухоли стандартом адъювантной терапии является гормонотерапия в сочетании и лучевой и химиотерапией при наличии показаний. Выбор тактики терапии осуществляется на основании рекомендаций российских и международных клинических руководств (Harris L, 2016; Adjuvant! Online, NCCN, 2015, Maxwell A.E, 2003). Тем не менее, традиционные клинко-морфологические характеристики заболевания, такие как размер первичной опухоли, характер местного распространения, степень злокачественности и др. не всегда способны обеспечить необходимую прецизионность выбора терапии (Hopton, D., 1989; Dignam J.J, 2009). Подобная ситуация диктует необходимость создания диагностического инструмента, способного на основе многопараметрической оценки клинко-морфологических и фенотипических особенностей РМЖ обеспечить обоснованный выбор адъювантной терапии, в особенности у пациентов, для которых сочетание классических факторов прогноза невозможно трактовать однозначно, то есть, на основании про/ретроспективной оценки выделить группу пациентов, которым, несмотря на благоприятное сочетание факторов прогноза, показано проведение адъювантной химиотерапии, а также пациентов, не нуждающихся в дополнительном цитостатическом лечении, несмотря на неблагоприятное сочетание "классических" факторов прогноза (Goldhirsch A., 2013; В.Ф. Семиглазов, 2012). В связи с тем, что используемые в настоящее время в клинике прогностические модели формируют достаточно гетерогенную группу больных в отношении риска прогрессирования, достаточно трудно оценить эффективность отдельных видов терапии. В частности, влияние адъювантной химиотерапии на десятилетнюю выживаемость без прогрессирования у больных без метастазов в регионарные лимфоузлы (N0) оценивается как низкое (абсолютный эффект

составляет 4%) (Fisher В, 2004) одновременно, приблизительно 50% больных ранним РМЖ (I-II стадия заболевания) получают адъювантную химиотерапию (АХТ), которая характеризуется выраженными токсическими эффектами, что в значительной степени снижает качество жизни (ЕВСТСГ 2005, Goldhirsch А., 2011, Michael Gnant, 2012, Dowsett M, 2011). Согласно результатам исследований NSABPB-14, В-20 проведение послеоперационной химиотерапии и эндокринотерапии повышает как общую, так и безрецидивную выживаемость больных раком молочной железы в случае эстроген-положительного фенотипа опухоли. Однако, отдаленные метастазы в течение 10 лет при проведении эндокринотерапии развиваются только у 35% больных (Paik S, 2006, Wang Y, 2005). Таким образом, проведение химиотерапии остальным 65% больных не должно отразиться ни на общей, ни на безрецидивной выживаемости. Подбор правильного алгоритма терапии при лечении рака молочной железы является актуальной задачей (Харченко В.П., 2001, Jemal А., 2007). Значительное количество клинических наблюдений и данных о биологической гетерогенности опухоли свидетельствуют о том, что пациенты отвечают по-разному на адъювантную терапию. В частности, обзоры рандомизированных исследований свидетельствуют, что терапевтический эффект химиотерапии значительно выражен у молодых женщин (Sorlie Т., 2001, Brenton J.D., 2005, Parker J.S, 2009). Фенотипическая гетерогенность рака молочной железы на сегодняшний день не оставляет сомнений (Sotiriou С et al, 2009, Goldhirsch А., 2005, Jalava P., 2006). С 2011 года согласно рекомендациям группы экспертов StGallen 2011 (Goldhirsch А., 2011) молекулярно-биологическая классификация рака молочной железы включает несколько подтипов, на основе которой построены рекомендации к выбору адъювантной терапии (ЕВСТСГ, 2005). В таблице 4.1 приведены критерии, используемые в настоящее время для выбора объема адъювантной терапии у больных рецептор-позитивным РМЖ.

Таблица 4.1 — Рекомендации панели экспертов St. Gallen по верификации и фенотипа РМЖ и выбору адъювантной терапии

Биологический тип	Морфологические критерии	Схема терапии
Люминальный тип А	- EEP/PP положительный - HER2 отрицательный - Ki 67 менее 20% низкий RS на основе МП	ЭТ
		± ХТ
Люминальный тип В (HER2 отрицательный)	- EP положительный - HER2 отрицательный - Высокий Ki 67 - PP отрицательный/низкий высокий RS на основе МП	ЭТ ± ХТ
ЭТ - эндокринотерапия; ХТ - химиотерапия		

Понимание патогенетических механизмов канцерогенеза при РМЖ позволяет определить вектор планируемой терапии, путем воздействия на ключевые элементы активности клетки: использование гормонотерапии в случае экспрессии клетками опухоли рецепторов стероидных гормонов и дополнение ее химиотерапией при высокой пролиферативной активности. Однако, подобный подход не обеспечивает достаточной прецизионности для индивидуализации терапии. В частности, иммуногистохимические критерии, принятые для стратификации молекулярного подтипа, не всеми экспертами рассматриваются как объективные. Уровень иммуногистохимической оценки экспрессии Ki67 для люминального подтипа В был пересмотрен с 14% до 20% (Eifel P., 2001), что свидетельствует об отсутствии достаточной точности выбранных критериев для оценки прогноза безрецидивной выживаемости РМЖ и, соответственно, решения вопроса о назначении адъювантной химиотерапии. В случае люминальных подтипов А и В рекомендации в пользу назначения АПХТ являются достаточно условными (Jalava P, 2006). Это, вероятно, также является следствием недостаточной прецизионности используемых маркеров. Именно пациенты с так называемым люминальным А и В фенотипом РМЖ составляют наиболее сложную категорию для выбора адъювантной терапии, т.к. подобный фенотип предполагает использование эндокринотерапии в качестве первой линии, а

показания для дополнительного включения цитотоксической терапии остаются часто необоснованными. Мировыми экспертами признается недостаточность существующих морфо-молекулярных маркеров и показаний к назначению цитотоксической терапии (Hassett M.J., 2012; Chang J.C. 2003). Решением этой проблемы может быть использование экспрессионных панелей для стратификации пациенток на основании оценки риска развития рецидива – как основного показателя неблагоприятного прогноза (Ravdin P.M., 2001; Muss H.B., 2009, Olivotto I.A, 2008; Ma, X.J., 2006; Gayathri, N., 2013). Введение в клиническую практику более точных критериев оценки вероятности отдаленного метастазирования у больных люминальным РМЖ позволит с большей достоверностью выделить группу больных, которым необходима адъювантная химиотерапия (Eifel P., 2001). Наиболее оптимальным и научно обоснованным является алгоритм расчета риска отдаленного метастазирования на основании количественной оценки профиля экспрессии генов, отражающих активность пролиферации, апоптоза, свойства клеточной миграции и адгезивности, активности рецепторов стероидных гормонов. Одним из основных противоречий, связанных с интерпретацией биологических феноменов в клинической практике, является сложность клинической оценки и часто излишняя информативность молекулярных моделей, что тормозит их применение в клинической практике. С другой стороны, рутинно используемые в клинике методы молекулярного фенотипирования рака молочной железы, не обладают необходимой прецизионностью для описания индивидуального портрета опухоли с позиции молекулярной классификации. Эксперты признают, что, например, дифференциальная оценка люминального фенотипа А и HER2/neu-негативного люминального фенотипа В представляет большую проблему, с чем связано колебание пограничных значений в оценке экспрессии KI67 (Goldhirsch A., 2013). В нашем исследовании люминальный фенотип А отличался не только уникальными значениями экспрессии KI67, но и ряда других генов, контролируемых не только процессы пролиферации, но и апоптоза и клеточной дифференцировки.

Клиническое значение классических маркеров фенотипирования (KI67, PЭ, PП, HER2/neu) хорошо известно, как и их корреляция с риском прогрессирования РМЖ (Lelle, R.J., 1990; Taneja P, 2010, Banin Hirata ВК, 2014). Результаты проведенного исследования обнаружили аналогичные закономерности для отличий уровней экспрессии генов, кодирующих эти маркеры, в различных фенотипах. Это свидетельствует о том, что выбранные маркеры адекватно отражают фенотипические отличия и достаточны для классификации ключевых люминального, базального и HER2/neu- позитивного фенотипов, что подтверждено как другими исследованиями (Nielsen TO, 2004, Carey LA, 2006, Cheang M.C, 2008), так и нашими результатами: совпадение классификации расширенной (21 гена) и редуцированной модели (4 гена - KI67, PЭ, PП, HER2/neu) по основным фенотипам составило 90,2%. Однако, для более точной оценки индивидуального фенотипа их недостаточно, этим объясняется низкая воспроизводимость результатов классификации при использовании редуцированной модели. В частности, для образцов люминального фенотипа, редуцированная модель продемонстрировала явную недостаточность мощности классификации низкопролиферирующего и высокопролиферирующего фенотипов. Это может быть связано с тем, что при сравнительном уровне экспрессии рецепторов эстрогена, что соответствует и результатам нашего исследования, люминальный фенотип А отличают гораздо более значительные изменения экспрессии BIRC5, TERT и PTEN, PGR, чем KI67 (Weier H.U, 2013, The Cancer Genome Atlas Network, 2012). Именно поэтому необходимо внесение дополнительных факторов для большей дискриминации люминальных фенотипов (Green A.R, 2013).

Этот вывод также подтверждается при сравнении результатов анализа выживаемости. Сохранение статистической значимости отличий средних значений выживаемости в группах, классифицированных редуцированной моделью, подтверждает, что выбранные маркеры в целом коррелируют с прогнозом заболевания. Однако смещение кривых выживаемости, по сравнению с анализом на основании расширенной панели, связано с появлением внутренней

фенотипической гетерогенности вновь сформированных групп. Таким образом, точность модели на основе анализа четырех фенотипических маркеров недостаточна для индивидуализации фенотипа и статистически значимые отличия выживаемости фенотипических групп в целом не обеспечивают необходимой прецизионности для отдельных пациентов.

Расширение стандартной панели анализа экспрессии генов в ткани РМЖ для определения молекулярного фенотипа позволит с большей точностью верифицировать фенотип опухоли, что значительно повысит точность диагноза для отдельных пациентов. Кроме того, стандартизация методов РВ-ПЦР и внедрение их в клиническую практику, также позволит сделать диагностические панели более гибкими и устойчивыми, как в отношении количества исследуемых маркеров, так и в отношении объективизации результатов анализа.

В основе разработанной технологии лежит анализ экспрессии генов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (РВ-ПЦР). Панель включает 24 гена (21 функциональный и 3 референсных гена). В таблице 2.16 (глава 2. Материалы и методы) представлены выбранные для панели гены, для удобства интерпретации сгруппированные согласно функциональной активности. Результаты анализа экспрессии генов включаются в алгоритм для верификации риска рецидива и определения вероятного интервала времени до наступления рецидива в группе высокого риска. Прецизионная оценка уровня пролиферативной активности, апоптоза, степени дифференцировки опухоли и т.д. позволяют с большой точностью определять степень вероятности и потенциал отдаленного метастазирования опухоли. Уровень экспрессии функциональных генов рассчитывается относительно референсных генов. Значения, полученные в результате анализа, являются переменными в алгоритме расчета риска отдаленного метастазирования. Окончательным результатом прогностической модели является оценка риска прогрессирования РМЖ в зависимости от планируемой схемы адъювантной терапии. Это существенным образом отличает разработанную нами технологию прогноза развития рецидива и, основанную на ней, оптимизацию программ лечения РМЖ от уже существующих.

Рассматривая оптимизацию программ лечения, необходимо отметить, что несомненно важнейшим этапом является хирургический, именно от успешности реализации именно этого этапа, оптимизации объема хирургического вмешательства (Galimberti, V., 2013; Дружков, О.Б., 2010; Волченко, А.А., 2014) во многом зависит эффективность всего комплексного лечения.

В основе принципов определения хирургической тактики лечения РМЖ в большинстве клиник мира используются рекомендации ESMO, NCCN. Основой для выбора вариантов лечения в них являются: морфологические критерии, такие как размер опухоли, поражение регионарных лимфатических узлов, мультицентричность, молодой возраст пациенток и ряд других. Считается, что результаты иммуногистохимического исследования носят вторичный характер. При этом у пациентов I-II стадии РМЖ наравне с радикальными мастэктомиями допускается выполнение экономных резекций, что в ряде случаев создает неопределенность при выборе тактики хирургического лечения (Krekel, N.M.(1), 2011; Krekel, N.M.(2), 2011). Появление местных рецидивов при органосохраняющих резекциях молочных желез во многом можно объяснить качеством и хирургического лечения и предоперационной диагностикой. Часть причин связана с не радикальностью хирургического лечения и продолженным ростом опухоли. Однако, в ряде случаев довольно сложно объяснить случаи местного и регионарного рецидивирования при чистых краях резекции удаляемого сектора, при большом (более 2 см) отступе от опухоли. Появление ЛРР в данных случаях может указывать особенности биологических свойств опухолей, отражающихся на их свойствах к метастазированию.

Таким образом, целью нашего исследования являлось уточнение тактики хирургического лечения больных I-II стадиями рака молочной железы на основании комплекса клинических, морфологических и генетических характеристик первичной опухоли.

Для решения этой задачи мы исследовали клинические и экспрессионные данные в ткани опухоли у 98 больных раком молочной железы перенесших органосохраняющие резекции. Оценивались данные историй болезни, а также

гистологический материал первичной опухоли в виде парафиновых блоков. Соотношение группы прогрессирования и благоприятного исхода лечения при наблюдении 5 лет и более составило 33/65 пациентки. В исследование не включались пациентки перенесшие неoadьювантную химиотерапию. В исследование включались пациентки ФБГУ “Российского Научного Центра Рентгенрадиологии Минздрава России” и Онкологического клинического диспансера № 1 г. Москвы.

Нами была исследована возможность прогноза развития ЛРР на основании клинических данных и данных уровня экспрессии генов в ткани опухоли (21 ген, использованный нами для определения молекулярных фенотипов опухоли). Мы применили многомерные методы анализа данных и показали, что дискриминантный анализ позволят создать прогностическую модель с высоким уровнем точности (более 95%), что в свою очередь позволяет прогнозировать риск развития ЛРР на дооперационном этапе.

Клиническая ценность разработанной модели заключается в том, что она позволяет уточнить прогноз заболевания относительно ЛРР для “спорных” случаев, в которых хирург сомневается относительно тактики хирургического лечения. Полученные данные позволили нам включить в алгоритм лечения пациенток с I-II РМЖ молекулярно-генетические исследования не только для прогнозирования адьювантной химиотерапии, но и для планирования хирургического этапа лечения. На первом этапе предлагается выявление групп пациенток с I-II стадией РМЖ, морфологическое подтверждение диагноза, определение биологического подтипа опухоли на основании иммуногистохимического исследования. Одновременно выявляются факторы неблагоприятного прогноза, такие как мультицентрический рост и/или диффузное скопление микрокальцинатов, молодой возраст пациенток, мутации в генах BRCA 1 и 2. Выявление только одного из этих неблагоприятных факторов, риск ЛРР расценивается как высокий и рекомендуется выполнение мастэктомии. При отсутствии данных неблагоприятных факторов на амбулаторном этапе производится оценка риска развития ЛРР на основе разработанной

математической модели. Группе пациентов с низким риском развития ЛРР предлагается выполнять органосохраняющие резекции в комбинации с послеоперационной лучевой терапией, а группе пациентов с высоким риском рекомендуется выполнение радикальной мастэктомии. При этом для этой группы рассчитывается риск отдаленного рецидивирования (метастазирования) на основании другой, предложенной нами модели, с учетом планируемой химиотерапии, и даются рекомендации по выбору наиболее безопасного варианта адъювантной химиотерапии. Мы считаем, что предложенный нами алгоритм позволит снизить риски как местного и регионарного рецидива, так и риски отдаленного метастазирования. Полученные нами результаты, высокая точность прогнозирования риска развития как ЛРР так и отдаленных метастазов, а модифицированный алгоритм выбора тактики лечения могут являться ориентирами по оптимизации лечения больных ранними стадиями РМЖ, а также проведения последующих исследований с использованием больших клинических групп для разработки клинических рекомендаций.

ВЫВОДЫ

1. Уровень экспрессии маммаглобина в ткани РМЖ значимо выше, чем в окружающей ткани МЖ и ткани МЖ при доброкачественных заболеваниях. Наиболее значительное повышение характерно для ранних стадий РМЖ (Т1-2, N0-1). Обнаружение мРНК маммаглобина в периферической крови, как метод диагностики РМЖ, показал специфичность – 93,0%, чувствительность 61,0%. Не обнаружена экспрессия мРНК маммаглобина в крови при другой локализации опухолевого процесса (рак шейки матки, эндометрия, предстательной железы, рак почки, рак желудка).

2. Увеличение размеров опухоли, появление метастазов и увеличение степени злокачественности сопровождается повышенной экспрессией *BIRC5*, *STK15*, *VAX*, *CTSL2*, *c-erbB2*, *GRB7* и сниженным уровнем *PTEN* и *MGB1*. Анализ уровня экспрессии мРНК исследуемых генов показал, что в ряду патологически неизменная ткань – фиброаденома - РМЖ наблюдается повышение экспрессии маркеров пролиферации *KI67*, *STK15* и *CCNB1*, ингибитора апоптоза *BIRC5* и матриксной металлопротеиназы *MMP11*, снижение экспрессии ингибиторов пролиферации *PTEN* и *NDRG1*.

3. Молекулярно-биологическое исследование образца ткани молочной железы, включающее определение уровня экспрессии таких генов, как *Ki67*, *STK15*, *BIRC5*, *CCNB1*, *MMP1*, *MGB1* позволяет с высокой достоверностью отличить доброкачественную и злокачественную ткань молочной железы в случаях, когда постановка диагноза клинико-радиологическими методами затруднена. Включение молекулярно-биологического исследования в диагностический комплекс повышает общую эффективность диагностики с 81% до 96%.

4. Оптимизация методики анализа мРНК в парафинизированной ткани (подбор условий выделения, проведения реакции, подбор праймеров и ампликонов, выбор исследуемых генов) позволила разработать диагностические наборы для исследования заболеваний МЖ.

5. Использование комплекса многопараметрических методов (метод К-средних, алгоритм «деревьев» классификации, дискриминантный анализ, нейронные и Байесовские сети) позволило на основании экспрессионного профиля провести устойчивую кластеризацию образцов тканей РМЖ на 5 групп соответствующих классическим молекулярным фенотипам.

6. Разработан алгоритм применения оригинального диагностического набора реагентов для определения молекулярных фенотипов РМЖ на основе анализа мРНК 24 генов методом РВ-ПЦР в парафиновых блоках, позволяющий повысить эффективность определения фенотипа РМЖ.

7. Разработаны алгоритмы оценки риска рецидивирования РМЖ в зависимости от планируемой адъювантной терапии и объема хирургического этапа лечения, позволяющие индивидуализировать программы лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В качестве способа диагностики заболеваний молочной железы предлагается к применению разработанная тест-система на основании обнаружения изменения уровня экспрессии генов Ki67, STK15, BIRC5, CCNB1, MMP1, MGB1 методом количественной ПЦР в гистологических образцах молочной железы. Материал, необходимый для молекулярно-биологического исследования, отбирается в ходе прицельной тонкоигольной биопсии. В случае увеличения экспрессии мРНК одного и более генов из группы, включенных в молекулярно-биологический алгоритм и имеющих значения больше критического, врачами клинической лабораторной диагностики или врачами-генетиками делается заключение о возможности злокачественного характера процесса и целесообразности дальнейшего обследования пациента профильными специалистами.

Применение молекулярно-генетических технологий для уточняющей диагностики изменений молочной железы возможно как на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи, так и в практике работы специализированных стационарных учреждений врачами клинической лабораторной диагностики/врачами-генетиками в условиях клинико-диагностических лабораторий.

С целью оптимизации лечебно-диагностического процесса рекомендуется внесение изменений в клинический алгоритм обследования пациенток с доброкачественными и злокачественными новообразованиями молочной железы. Использование предложенных технологий, уточняющей диагностики заболеваний МЖ, уменьшает период времени, затраченный на постановку диагноза, пребывание пациента в стационаре, снижает риск неоправданных хирургических вмешательств вследствие ложно-положительных цитологических заключений о характере процесса.

Для использования в клинической практике предлагается метод диагностики ранних стадий РМЖ на основе обнаружения мРНК маммоглобина в периферической крови, описанный в диссертации.

Определение молекулярного фенотипа ткани при РМЖ вошло в стандарты обследования пациентов с этой патологией. Разработанный способ оценки молекулярного фенотипа методом РВ-ПЦР, основанный на анализе экспрессии генов в ткани опухоли с использованием оригинальных тест-систем, более эффективен в сравнении с рутинным ИГХ методом.

На основании анализа профиля экспрессии генов в ткани первичной опухоли с использованием оригинальных тест-систем, предложены алгоритмы формирования неблагоприятных групп прогноза для ранних стадий РМЖ. Разработанные инструкции к тест-системам подробно описывают процедуры и порядок их применения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АПХТ — адъювантная полихимиотерапия

ГТ — гормональная терапия

РМЖ — рак молочной железы

ЛРР — локорегионарный рецидив

ЛР — локальный рецидив

РМЭ — радикальная мастэктомия

ЛТ — лучевая терапия

ИГХ — иммуногистохимическое исследование

ЭР — рецепторы эстрогена

РП — рецепторы прогестерона

ВОЗ — всемирная организация здравоохранения

NSABP (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project) — Национальный хирургический проект адъювантной терапии рака молочной железы и кишечника (США)

ESMO (European Society for Medical Oncology) — европейское общество медицинской онкологии

NCCN (National comprehensive cancer network) — национальная всеобъемлющая сеть рака

EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) — Европейская организация по исследованию и лечению рака

МЖ — молочная железа

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

РВ-ПЦР — полимеразная цепная реакция в реальном времени

мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота

МНТ — морфологически неизменная ткань

ФА — фиброаденома

о.е. — относительные единицы экспрессии

Ki-67 — ядерный белок, определяемый в S, G1, G2 и M-фазах митоза.

HER2/neu (Human Growth Factor Receptor 2) — Рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2

STK-15 (Serine/threonine-proteinkinase 15) — Серин/треонин-протеин киназа 15.

CCNB1(CyclinB1) — циклин B1

CCND1(CyclinD1) — циклин D1

MYC — регуляторный ген, участвует в процессе транскрипции.

MYBL2 (Myeloblastosis oncogene-like 2) – онкоген миелобластоза 2 типа.

P16INK4A — ген-регулятор, циклин-зависимого ингибитора киназы 4A

PTEN (phosphatase and tensin homolog) — гомолог фосфатазы итензина, ген опухолевой супрессии.

BIRC5 — ингибитор ответа апоптозных повторов 5/ Сурвивин.

BCL2 (B-cell lymphoma 2) — генВ-клеточной лимфомы 2, регулятор апоптоза.

BAG1 (BCL2-AssociatedAthanogene) — BCL2 ассоциированный ген, регулятор апоптоза.

TERT (Telomerase reverse transcriptase) — ген обратной транскриптазы, препятствующей укорочению теломер в процессе деления.

NDRG1 (N-Myc Downstream Regulated) — N-Мусподавляющийген.

GRB7 (Growth factor receptor-bound protein 7) — генрецептор-связанногофакторароста 7

ESR1 — ген экспрессии рецепторов эстрогена

PGR — ген экспрессии рецепторов прогестерона

MGB1 — ген экспрессии маммаглобина

MMP11 (matrix metalloproteinase 11) — ген матричной металлопептидазы 11

CTSL2 (CathepsinL2) — ген, регулирующий активностькатеписинаL2

CD68 (Cluster of Differentiation 68) — кластер дифференцировки 68, макросиалин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белохвостов, А.С. Онкомаркеры, молекулярногенетические, иммунохимические, биохимические анализы / А.С. Белохвостов, А.Г. Румянцев // МАКС Пресс, М -2013.
2. Боженко, В.К. Маммаглобин в периферической крови и опухоли при раке молочной железы / В.К. Боженко, Н.В. Харченко, Е.Ф. Васкевич, Е.А. Кудинова, А.В. Ооржак, Н.И. Рожкова, И.Д. Троценко // Биомедицинская химия. - 2016.-N 4:453-457.
3. Боженко, В.К. Многопараметрический анализ лабораторных показателей крови для получения диагностической информации в экспериментальной и клинической онкологии/ Боженко В.К. //Дис. докт. мед. наук. - Москва. - 2004.- С.186-196.
4. Волченко, А.А. Выбор реконструктивно-пластических операций при комплексном лечении больных раком молочной железы / А.А. Волченко, В.И. Чиссов, А.Д. Зикиряходжаев // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2014. - № 1. - С.3-9.
5. Ганьшина, И.П. Гиперэкспрессия HER2/NEU – новые возможности в лечении рака молочной железы «РМЖ» / И.П. Ганьшина // №13 от 12.07.2005 стр. 869
6. Герштейн, Е.С. Клиническое значение исследования рецепторов эпидермального фактора роста при раке молочной железы / Е.С. Герштейн, Л.С. Бассалык, В.П. Летягин // Вопр. онкол. - 1994. - Т. 40(7-12). - С. 266-275.
7. Гришина, К.А. Молекулярно-генетические маркеры рака молочной железы / К.А. Гришина, Т.А. Музаффарова, В.А. Хайленко, А.В. Карпухин // Опухоли женской репродуктивной системы - 2016. - Том 12.- Vol. 12
8. Давыдов, М.И. Статистика злокачественных заболеваний в России и странах СНГ / М.И. Давыдов, Е.М. Аксель // Москва. Изд.группа РОНЦ. - 2014. - с.63.

9. Дружков, О.Б. Оптимизация резекционных методов хирургического компонента в комплексном лечении рака молочной железы/Дружков О.Б., Дружков Б.К., Гатауллин И.Г //Медицинский Альманах.- 2010.- 3. с.59-62.
10. Запирова, С.Б. Современное состояние вопроса лучевой диагностики узловых мастопатий/ С.Б. Запирова // Вестник РНЦРР МЗ РФ.- 2005.- N5.URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v5/papers/zap_v5.htm
11. Заридзе, Д.Г. Эпидемиология и этиология злокачественных новообразований. В кн.: Канцерогенез. Под ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина - 2004. - 29-85.
12. Имянитов, Е.Н. Молекулярная диагностика в онкологии/ Имянитов Е.Н. // Вопросы онкологии. - 2012. – 58(2):153-163.
13. Каприн, А.Д. Состояние онкологической помощи населению России в 2015 году / А.Д. Каприн, В.В. Старинский, Г.В. Петрова // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена □ филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. - 2016. □ с. 4-12.
14. Козлов, В.В. Роль молекулярных маркеров в диагностике и лечении рака молочной железы / Козлов В.В. // АВТОРЕФЕРАТ . - 2014. - Новосибирск.
15. Колесников, Р.В. Связь между местно-регионарными рецидивами и отдаленными метастазами рака молочной железы/ Колесников Р.В., Станоевич У.С., Гребенкин Е.Н.// Вестник РНЦРР МЗ РФ.-2013.-13. URL: http://vestnik.rncrr.ru/vestnik/v13/papers/kolesn_v13.htm.
16. Колядина, И.В. Гетерогенность раннего рака молочной железы: биологическое, популяционное и прогностическое значение/ Колядина И.В. // Дис. докт. мед. наук. - Москва. - 2015.- с. 333.
17. Колядина, И.В. Прогностическое значение рецепторного статуса опухоли при раннем раке молочной железы/ Колядина И.В., Поддубная И.В., Франк Г.А. // Современные технологии в медицине. -2012. -4. -С 48-53.,
18. Копнин, Б.П. Неопластическая клетка: основные свойства и механизмы их возникновения / Б.П. Копнин // Практическая онкология - 2002. - Т.3 - №4.

19. Косых, Э.А. Некоторые клинические характеристики локальных рецидивов рака молочной железы/ Косых Э.А.// Дальневосточный медицинский журнал.- 2013. - 2. с.36-37.
20. Кривохотько, П.В. Риск местного рецидива после органосохраняющих операций на молочной железе/ Кривохотько П.В., Семигразов В.В., Канаев С.В.//Вопросы онкологии. -2011. - 57 (4).- С. 627-635.
21. Кулигина, Е.Ш. Эпидемиологические и молекулярные аспекты рака молочной железы / Е.Ш. Кулигина // -2010. -ББК. -Р. -569.133.1
22. Лалак, И.А. Пути улучшения результатов органосохраняющего лечения у больных раком молочной железы/ Лалак И.А.//Дис. канд. мед. наук.- Санкт-Петербург.- 2015. - с. 130.
23. Литвяков, Н. В. Микроматричный анализ числа ДНК копий опухоли молочной железы: связь с эффектом неоадьювантной химиотерапии/ Литвяков Н. В., Цыганов М. М., Чердынцева Н. В. // Сибирский онкологический журнал. - 2014. - 3. С. 19-27.
24. Лушникова, А.А. Структура и экспрессия ММТВ-родственного провируса у больных раком молочной железы / Лушникова А.А.// Автореферат. - 2010. - Москва.
25. Любченко, Л.Н. Медико-генетическое консультирование и ДНК-диагностика при наследственной предрасположенности к раку молочной железы и раку яичников / Л.Н. Любченко, Е.И. Батенева // М., ИГ РОНЦ - 2014.
26. Маммология : национальное руководство / под.ред. А.Д. Каприн, Н.И. Рожкова // ГЭОТАР-Медиа. - 2016.
27. Рожкова, Н.И. Лучевая диагностика в маммологии/ Рожкова Н.И.// Руководство для врачей. – 2016. М. – С.68-84.
28. Рожкова, Н.И. Скрининг для ранней диагностики рака молочной железы / Н.И. Рожкова, Е.А. Рассказова // Исследования и практика в медицине. - 2014. -1(1):45-51.

29. Семиглазов, В.Ф. Неoadьювантная терапия гормонзависимого рака молочной железы / В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, А.Г. Манихас // Злокачественные опухоли. - 2012. - 2 (2):6-10.
30. Семиглазов, В.Ф. Стратегические и практические подходы к решению проблемы рака молочной железы/ Семиглазов В.Ф.// Вопросы онкологии. - 2012. - 58, с. 148-152.
31. Семиглазова, Т.Ю. Инновационные таргетные препараты при метастатическом раке молочной железы / Т.Ю. Семиглазова, В.В. Семиглазов, А.В. Филатова, П.В. Криворотько, Р.М. Палтуев, Д.Х. Латипова, М.Л. Гершанович // Онкология. - 2012. - N 2:94-99.
32. Сергеева, Н.С. Современные представления о серологических опухолеассоциированных маркерах и их месте в онкологии / Н. С. Сергеева, Н. В. Маршутина, М. П. Солохина, И. И. Алентов, Н. К. Парилова, Е. В. Зенкина, Т. Е. Скачкова // Успехи молекулярной биологии - 2014. - Т.1. -№1.
33. Солодкий, В.А. Диффузные доброкачественные заболевания молочной железы. Диагностика и лечение. Руководство для врачей / Солодкий, В.А. Рожкова Н.И. // СпецИздат. - 2012: 64-69
34. Солодкий, В.А. Новые технологии цифровой маммографии в ранней диагностике непальпируемых образований молочной железы/ Солодкий, В.А., Харченко Н.В., Гринберг М.В., Еремина И.З.// Здоровье и образование в XXI веке - 2015. - № 4(17): 49-51.
35. Тамкович, С.Н. Современные методы диагностики рака молочной железы / С.Н. Тамкович, В.Е. Войцицкий, П.П. Лактионов // Биомедицинская химия. - 2014. - том 60. - вып.2. - с.141-160.
36. Трошенков, Е.А. Проблемы диагностики и лечения первично операбельного рака молочной железы / Е.А. Трошенков, А.А. Костин // Исследования и практика в медицине. - 2015. - 2(2). - 35-43.
37. Франк, Г.А. Классификация опухолей молочной железы ВОЗ 2012 / Г.А. Франк, Н.В. Данилова, Ю.Ю. Андреева, Н.А. Нефедова // Архив патологии том - 2013. - 75. - март-апрель. - стр. 53-63.

38. Харченко, В.П. Маммологическая служба в России / В.П. Харченко, Н.И. Рожкова // Врач. - 2001. - № 9. С. 42.
39. Харченко, В.П. Особенности развития и факторы риска постмастэктомических местно-регионарных рецидивов рака молочной железы/Харченко В.П., Хмелевский Е.В., Чхиквадзе В.Д. // Вопросы онкологии.- 2009.- т. 55(46).- С. 436-442.
40. Чиссов, В.И. О совершенствовании онкологической службы и улучшении онкологической помощи населению Российской Федерации/ В.И. Чиссов, В.В. Старинский, Л.М. Александрова, А.С. Лутковский, В.А. Савинов, Г.В. Петрова, О.П. Грецова, Н.В. Борисеева, Е.С. Былкова, Н.В. Харченко // Практическая медицина. – 2009.- 4 (36) июнь.- с.97-101.
41. Чиссов, В.И. Скрининг рака молочной железы: история и перспективы / В.И.Чиссов, В.А. Солодкий, Д.Д. Пак, Н.И. Рожкова, М.В. Ермощенкова, М.Н. Киреева // Онкология. - 2013.- N 2.-С.46-51.
42. Abou-Bakr, A.A. p16 expression correlates with basal-like triple-negative breast carcinoma / A.A. Abou-Bakr, H.I. Eldweny // Ecancermedicallscience. - 2013. - May. - 14;7:317.
43. Adjuvant! Online. www.adjuvantonline.com/index.jsp.
44. Alao, J.P. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention / J.P. Alao // Mol Cancer. - 2007. - Apr 2;6:24.
45. Albain, K. Prognostic and predictive value of the 21-gene recurrence score assay in postmenopausal women with node-positive, oestrogen-receptor-positive breast cancer on chemotherapy: a retrospective analysis of a randomised trial / K. Albain, W.E. Barlow, S. Shak // Lancet Oncology. - 2010. - 11(1): 55–65.
46. Albain, K.S. Adjuvant chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: a tale of three trials / K.S. Albain // J Natl Cancer Inst. - 2004. - Dec. - 15;96(24):1801-4.
47. Allott, E.H. Performance of Three-Biomarker Immunohistochemistry for Intrinsic Breast Cancer Subtyping in the AMBER Consortium / E.H. Allott, S.M.

Cohen, J. Geradts, X. Sun, T. Khoury, W. Bshara, G.R. Zirpoli, C.R. Miller, H. Hwang, L.B. Thorne, S. O'Connor, C.K. Tse, M.A. Troester // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* - 2016. - Mar. - 25(3):470-8.

48. Altieri, D.C. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm / D.C. Altieri // *J Cell Biochem.* - 2004. - Jul. - 1;92(4):656-63.

49. Ambrosini, G. Identification of unique MEK-dependent genes in GNAQ mutant uveal melanoma involved in cell growth, tumor cell invasion, and MEK resistance / G. Ambrosini, C.A. Pratilas, L.X. Qin, M. Tadi, O. Surriga, R.D. Carvajal, G.K. Schwartz // *Clin Cancer Res.* - 2012. - Jul.- 1;18(13):3552-61

50. Arvold, N.D. Age, Breast Cancer Subtype Approximation, and Local Recurrence After Breast-Conserving Therapy/ Arvold N.D., Taghian A.G., Niemierko A. // *Journal of clinical oncology.* - 2011. -29(29):3885-3891.

51. Asanuma, H. Survivin expression is regulated by coexpression of human epidermal growth factor receptor 2 and epidermal growth factor receptor via phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer cells / H. Asanuma, T. Torigoe, K. Kamiguchi, Y. Hirohashi, T. Ohmura, K. Hirata, M. Sato, N. Sato // *Cancer Reseach.* - 2005. - Dec. - 1;65(23):11018-25.

52. Asiago, V.M. Early detection of recurrent breast cancer using metabolite profiling / V.M. Asiago, L.Z. Alvarado, N. Shanaiah, G.A. Gowda, K. Owusu-Sarfo, R.A. Ballas, D. Raftery // *Cancer Res.* - 2010. - Nov. - 1;70(21):8309-18.

53. Atalay, C. Breast conserving therapy/ Atalay C//*Gland Surgery.* -2012.- 1(2). P. 84-86.

54. Aziza, N. Survivin and Caspase-3 Expression in Breast Cancer: Correlation With Prognostic Parameters, Proliferation, Angiogenesis, and Outcome / N. Aziza // *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.* - 2008. - 16: 113-120.

55. Backus, J. Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis / J. Backus, T. Laughlin, Y. Wang, R. Belly, R. White, J. Baden, C. Justus Min, A. Mannie, L. Tafra, D. Atkins, K.M. Verbanac // *J Mol Diagn.* - 2005. - Aug. - 7(3):327-36.

56. Baehner, F.L. Human epidermal growth factor receptor 2 assessment in a case-control study: comparison of fluorescence in situ hybridization and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction performed by central laboratories / F.L. Baehner, N. Achacoso, T. Maddala // *J Clin Oncol.* - 2010. - 28: 4300-4306.
57. Baffy, G. Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production / G. Baffy, T. Miyashita, J.R. Williamson, J.C. Reed // *J Biol Chem.* - 1993. - Mar. - 25;268(9):6511-9
58. Banin Hirata, B.K. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior / B.K. Banin Hirata, J.M. Oda, R. Losi Guembarovski, C.B. Ariza, C.E. de Oliveira, M.A. Watanabe // *Dis Markers.* - 2014; 2014:513158.
59. Barajas-Castañeda, L.M. Overexpression of MMP-3 and uPA with Diminished PAI-1 Related to Metastasis in Ductal Breast Cancer Patients Attending a Public Hospital in Mexico City / L.M. Barajas-Castañeda, E. Cortés-Gutiérrez, F.M. García-Rodríguez, R. Campos-Rodríguez, E. Lara-Padilla, F. Enríquez-Rincón, M.E. Castro-Mussot, P. Figueroa-Arredondo // *J Immunol Res.* - 2016. - 8519648.
60. Barr, F.E. Estrogen receptor expression in atypical hyperplasia: lack of association with breast cancer / F.E. Barr, A.C. Degnim, L.C. Hartmann, D.C. Radisky, J.C. Boughey, S.S. Anderson, R.A. Vierkant, M.H. Frost, D.W. Visscher, C. Reynolds // *Cancer Prev Res (Phila).* - 2011. - Mar. - 4(3):435-44.
61. Baselga, J. Lapatinib with trastuzumab for HER2- positive early breast cancer (NeoALTTO): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial / J. Baselga, I. Bradbury, H. Eidtmann // *Lancet.* - 2012. - 379: 633-640.
62. Bassik, M.C. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis / Bassik M.C., Scorrano L., Oakes S.A., Pozzan T., Korsmeyer S.J.// *EMBO J.* - 2004. - Mar. - 10;23(5):1207-16.
63. Bauman, L. Breast conservation in women with multifocal-multicentric breast cancer: is it feasible? / L.Bauman, R.J. Barth, K.M. Rosenkranz // *Ann Surg Oncol.* - 2010. - 17: 325-329.

64. Bazarov, A.V. Who is in the driver's seat in 8p12 amplifications? ZNF703 in luminal B breast tumors/ A.V. Bazarov, P. Yaswen // *Breast Cancer Res.* - 2011. - May. - 25;13(3):308.
65. Bleyer, A. Effect of Three Decades of Screening Mammography on Breast-Cancer Incidence / A. Bleyer, H.W. Welch // *N Engl J Med.* - 2012. - 367: 1998- 2005.
66. Bolufer, P. Epidermal growth factor receptor in human breast cancer: correlation with cytosolic and nuclear ER receptors and with biological and histological tumor characteristics / P. Bolufer, F. Miralles, A. Rodriguez, C. Vazquez, A. Lluch, J. Garcia-Conde, T. Olmos // *Eur J Cancer.* - 1990. - Mar. -26(3):283-90
67. Bonsing, B. A. High Levels of DNA Index Heterogeneity in Advanced Breast Carcinomas Evidence for DNA Ploidy Differences between Lymphatic and Hematogenous Metastases / B.A. Bonsing, H. Beerman, N. Kuipers-Dijkshoorn, G.J. Fleuren, C.J. Cornelisse // *CANCER.* - 1993. - January. - 15;(71):2993.
68. Bourmenskaya, O. Host gene expression profiling of cervical smear is eligible for cancer risk evaluation/ O. Bourmenskaya, E. Shubina, D. Trofimov, Ds. Rebrikov, E. Sabdulaeva, O. Nepsh, V. Bozhenko, S. Rogovskaya, G. Sukhikh// *J Clin Pathol.*-2012.-. doi:10.1136/jclinpath-2012-201313.
69. Branchini, G. Progesterone receptors A and B and estrogen receptor alpha expression in normal breast tissue and fibroadenomas / G. Branchini, L. Schneider, R. Cericatto, E. Capp, I.S. Brum // *Endocrine.* - 2009. - Jun. - 35(3):459-66.
70. Brenton, J.D. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? / J.D. Brenton, L.A. Carey, A.A. Ahmed, C.Caldas // *J Clin Oncol.* - 2005. - Oct. - 10;23(29):7350-60.
71. Brown, N.E. Cyclin D1 activity regulates autophagy and senescence in the mammary epithelium /N.E. Brown, R. Jeselsohn, T. Bihani, M.G. Hu, P. Foltopoulou, C. Kuperwasser, P.W. Hinds // *Cancer Res.* - 2012. - Dec 15;72(24):6477-89.
72. Buchholz, T.A. Margins for breast-conserving Surgery with whole-breast irradiation in stage I and II invasive breast cancer: American society of clinical oncology endorsement of the society of surgical oncology/American society for

radiation oncology consensus guideline/ Buchholz T.A., Somerfield M.R., Griggs J.J.// Journal of clinical oncology. - 2014. - 32 (14): 1502-1507.

73. Buseman, C.M. Is telomerase a viable target in cancer? / Buseman CM, Wright WE, Shay JW.// Mutat Res.- 2012.- Feb.- 1;730(1-2):90-7

74. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.Cancer Genome Atlas Network // Nature. - 2012. - Oct. - 4;490(7418):61-70.

75. Cao, J.Q. Comparison of recurrence and survival rates after breast-conserving therapy and mastectomy in young women with breast cancer/ Cao J.Q., Olson R.A., Tyldesley S.K. // Current Oncology. - 2013. -20(6): 593-601.

76. Carey, L.A. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study / L.A. Carey , C.M. Perou, C.A. Livasy, L.G. Dressler, D. Cowan, K. Conway, G. Karaca, M.A. Troester, C.K. Tse, S. Edmiston, S.L. Deming, J. Geradts, M.C. Cheang, T.O. Nielsen, P.G. Moorman, H.S. Earp, R.C. Millikan // JAMA. - 2006. - Jun. - 7;295(21):2492-502.

77. Carlson, R.W. Invasive breast cancer / R.W. Carlson, B.O. Anderson, H.J. Burstein, W.B. Carter, S.B. Edge, W.B. Farrar, L.J. Goldstein, W.J. Gradishar, D.F. Hayes, C.A. Hudis, M. Jahanzeb, B.M. Ljung, K. Kiel, L.B. Marks, B. McCormick, L.M. Nabell, L.J. Pierce, E.C. Reed, S.M. Silver, M.L. Smith, G. Somlo, R.L. Theriault, J.H. Ward, E.P. Winer, A.C. Wolff // Journal of the National Comprehensive Cancer Network - 2005. - № 5(3). - C. 246-312.

78. Carlson, R.W. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer / R.W. Carlson, D.C. Allred, B.O. Anderson // Version 3. - 2012. URL: www.nccn.org (accessed 17.01.2013).

79. Caruso, F. Nipple sparing subcutaneous mastectomy: sixty-six months follow-up / F. Caruso, M. Ferrara, G. Castiglione, G. Trombetta, L. De Meo, G. Catanuto, G. Carillio // Eur J Surg Oncol. - 2006. - 32(9): P.937.

80. Centraal Begeleidings Orgaan (CBO). Fysieke en cognitieve effecten, voorlichting en psychosociale zorg // In: Richtlijn mammacarcinoom - 2008. - P. 222-224.

81. Chae, S.W. Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications/ Chae S.W., Sohn J.H., Kim D.H., Choi Y.J., Park Y.L., Kim K., Cho Y.H., Pyo J.S., Kim J.H.//Yonsei Med. J. - 2011.- 52: 445-53.
82. Chae, Y.K. Reduced risk of breast cancer recurrence in patients using ACE inhibitors, ARBs, and/or statins/ Y.K. Chae, M.E. Valsecchi , J. Kim , A.L. Bianchi, D. Khemasuwan, A. Desai, W. Tester // Cancer Invest. - 2011. - Nov. - 29(9):585-93.
83. Chang, J.C. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer / J.C. Chang, E.C. Wooten, A. Tsimelzon, S.G. Hilsenbeck, M.C. Gutierrez, R. Elledge, S. Mohsin, C.K. Osborne, G.C. Chamness, D.C. Allred, P. O'Connell // Lancet. - 2003. - Aug. - 2;362(9381):362-9.
84. Chang, J.C. Genomic approaches in the management and treatment of breast cancer / J.C. Chang, S.G. Hilsenbeck, S.A.Fuqua // Br J Cancer. - 2005. - Feb. - 28;92(4):618-24.
85. Cheang, M.C. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype / M.C. Cheang, D. Voduc, C. Bajdik, S. Leung, S. McKinney, S.K. Chia, C.M. Perou, T.O. Nielsen // Clin Cancer Res. - 2008. - Mar. - 1;14(5):1368-76.
86. Cheang, M.C. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer / M.C. Cheang, S.K. Chia, D. Voduc // J Natl Cancer Inst. - 2009. - 101:736-750.
87. Chen, Y. Expert Rev. MYC in breast tumor progression / Y. Chen, O.I. Olopade // Anticancer Ther. - 2008. - Oct. - 8(10):1689-98.
88. Chu, E.C. PTEN regulatory functions in tumor suppression and cell biology / Chu E.C., Tarnawski A.S. // Med. Sci. Monit.- 2004.-10:235–241.
89. Chang, C.W. The clinical implications of MMP-11 and CK-20 expression in human breast cancer / Cheng C.W., Yu J.C., Wang H.W., Huang C.S., Shieh J.C., Fu Y.P., Chang C.W., Wu P.E., Shen C.Y.// Clin. Chim. Acta. -2010. – 411:234-41.

90. Cianfrocca, M. Goldstein L.J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer / M. Cianfrocca // *Oncologist*. - 2004. - 9: 606–616.
91. Cianfrocca, M. New Molecular Classifications of Breast Cancer/ M. Cianfrocca, W. Gradishar // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2009. – Vol.59, №5. – P.303.
92. Cifuentes-Rojas, C. Telomerase regulation/ C. Cifuentes-Rojas, D.E. Shippen // *Mutat Res*. - 2012. - Feb. - 1;730(1-2):20-7.
93. Cirak, Y. Aurora A overexpression in breast cancer patients induces taxane resistance and results in worse prognosis / Y. Cirak, Y. Furuncuoglu, O. Yapicier, A. Aksu, E. Cubukcu // *JBUON*. - 2015. - 20(6): 1414-1419.
94. Clarke, M. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials / M. Clarke, R. Collins, S. Darby, C. Davies, P. Elphinstone, V. Evans, J. Godwin, R. Gray, C. Hicks, S. James, E. MacKinnon, P. McGale, T. McHugh, R. Peto, C. Taylor, Y. Wang, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group // *Lancet*. - 2005. - Dec. - 17:366(9503):2087-106.
95. Coates, A. S. Tailoring therapies—improving the management of early breast cancer: St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2015/ Coates A. S., E. P. Winer E. P., Goldhirsch A. // *Annals of Oncology*. - 2015. - 26. - P. 1533–1546.
96. Coleman, M.P. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD) / Coleman M.P. // *Lancet Oncol*. - 2008. - 9, 730–56.
97. Collins, D.H. Is there a standard type and duration of adjuvant chemotherapy? / D. H. Collins // *Breast*. - 2009. - № 18.- C. 15.
98. Comen, E. Clinical implications of cancer self-seeding / E. Comen, L. Norton, J. Massagué // *Nat Rev Clin Oncol*. - 2011. - Jun. -8(6):369-77.
99. Conner-Spady, B.L. A longitudinal prospective study of health-related quality of life in breast cancer patients following high-dose chemotherapy with autologous blood stem cell transplantation / B.L. Conner-Spady, C. Cumming, J.M.

Nabholtz, P. Jacobs, D. Stewart // *Bone Marrow Transplant.* - 2005. - Aug. - 36(3):251-9.

100. Copois, V. Impact of RNA degradation on gene expression profiles: Assessment of different methods to reliably determine RNA quality/ Virginie Copois, Fr'ed'eric Bibeau, Caroline Bascoul-Mollevi, Nicolas Salvetat, Patrick Chalbos, Corinne Bareil, Laurent Candeil, Caroline Fraslou, Emmanuel Conseiller, Virginie Granci, Pierre Mazi`ere, Andrew Kramar, Marc Ychou, Bernard Pau, Pierre Martineau, Franck Molina, Maguy Del Rio// *Journal of Biotechnology.*- 2007.- 127: 549–559.

101. Coussens, L. Inflammatory cells and cancer: think different! / Coussens L., Werb Z. // *J. Exp. Med.* - 2001. - 193:23–F26.

102. Creighton, C.J. Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors / C.J. Creighton, C. Kent Osborne, M.J. van de Vijver // *Breast Cancer Res Treat.* - 2009. - 114: 287–299.

103. Cronin, M. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay / M. Cronin, M. Pho, D. Dutta, *American Journal of Pathology.* - 2004. - 164:35-42.

104. Cuconati, A. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells/ Cuconati A, Mukherjee C, Perez D, White E. // *Genes Dev.* - 2003. - Dec. - 17(23):2922-32.

105. Cui, X. Biology of progesterone receptor loss in breast cancer and its implications for endocrine therapy / X. Cui, R. Schiff, G. Arpino // *J Clin Oncol.* - 2005. - 23: 7721–7735.

106. Curran, S. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers/ Curran S., Dundas S.R., Buxton J., Leeman M.F., Ramsay R., Murray G.I.// *Clin Cancer Res.*- 2004.- Dec.- 10(24):8229-34.

107. Curtis, C. The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumor reveals novel subgroups / C. Curtis, S. P. Shah, S. F. Chin, G. Turashvili, O. M. Rueda, M. J. Dunning // *Nature.* - 2012. - 486(7403):346-352.

108. Cuzick, J. Prognostic value of a combined estrogen receptor, progesterone receptor, Ki-67, and human epidermal growth factor receptor 2 immunohistochemical score and comparison with the genomic health recurrence score in early breast cancer / J. Cuzick, M. Dowsett, S. Pineda // *J Clin Oncol.* - 2011. - 29: 4273–4278.

109. Dabbs, D.J. High false-negative rate of HER2 quantitative reverse transcription polymerase chain reaction of the Oncotype DX test: an independent quality assurance study / D.J. Dabbs, M.T. Klein, S.K. Mohsin // *J Clin Oncol.* – 2011. - 29: 4279–4285.

110. Danaei, G. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors/ Danaei, G. // *Lancet.*- 2005.-366, 1784–93.

111. Davies, C. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials / C. Davies, J. Godwin, R. Gray, M. Clarke, D. Cutter, S. Darby, P. McGale, H.C. Pan, Taylor C, Y.C. Wang, M. Dowsett, J. Ingle, R. Peto // *Lancet.* - 2011. - Aug. - 27; 378(9793):771-84.

112. Davis, B.W. Prognostic significance of tumor grade in clinical trials of adjuvant therapy for breast cancer with axillary lymph node metastasis / B.W. Davis, R.D. Gelber, A. Goldhirsch // *Cancer.* - 1986. - 58:2662-70. 36.

113. De Graffenried, L.A. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway/ De Graffenried L.A., Fulcher L., Friedrichs W.E., Grünwald V., Ray R.B., Hidalgo M. // *Ann. Oncol.*- 2004.- 15:1510-1516.

114. de Ronde, J.J. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response / J.J. de Ronde, J. Hannemann, H. Halfwerk // *Breast Cancer Res Treat.* - 2010. - 119:119-126.

115. Dedić Plavetić, N. Prognostic value of proliferation markers expression in breast cancer / N. Dedić Plavetić , J. Jakić-Razumović , A. Kulić , D. Vrbanec // *Med Oncol.* - 2013. - Jun. 30(2):523.

116. DeGraffenried, L.A. Reduced PTEN expression in breast cancer cells confers susceptibility to inhibitors of the PI3 kinase/Akt pathway/ L.A. DeGraffenried, L. Fulcher, W.E. Friedrichs, V. Grünwald , R.B. Ray, M. Hidalgo // *Ann Oncol.* - 2004. - Oct. -15(10):1510-6.

117. Denkert, C. Metabolomics of human breast cancer: new approaches for tumor typing and biomarker discovery / C. Denkert, E. Bucher, M. Hilvo, R. Salek, M. Orešič, J. Griffin, S. Brockmöller, F. Klauschen, S. Loibl, D.K. Barupal, J. Budczies, K. Iljin, V. Nekljudova, O. Fiehn // *Genome Med.* - 2012. - Apr 30. - 4(4):37.

118. Depowski, P.L. Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer / Depowski P.L., Rosenthal S.I., Ross J.S. // *Mod. Pathol.* - 2001. - 14: 672-676.

119. Dignam, J.J. Estimating breast cancer-specific and other-cause mortality in clinical trial and population-based cancer registry cohorts / J.J. Dignam, L. Huang, L. Ries, M. Reichman, A. Mariotto, E. Feuer // *Cancer.* - 2009. - Nov 15;115(22):5272-83.

120. Dignam, J.J. Estimating breast cancer-specific and other-cause mortality in clinical trial and population-based cancer registry cohorts / J.J. Dignam, L. Huang, L. Ries, M. Reichman, A. Mariotto, E. Feuer // *Cancer.* - 2009. - Nov. - 15;115(22):5272-83.

121. Ding, K. CCNB1 is a prognostic biomarker for ER+ breast cancer / K. Ding, W. Li, Z. Zou, X. Zou, C. Wang // *Med Hypotheses.* - 2014. - Sep. - 83(3):359-64.

122. Douglas-Jones, A.G. Molecular assessment of sentinel lymph node in breast cancer management / A.G. Douglas-Jones, V. Woods // *Histopathology.* - 2009. - Jul. - 55(1):107-13.

123. Dowsett, M. Comparison of PAM50 risk of recurrence (ROR) score with Oncotype DX and IHC4 for predicting residual risk of RFS and distant-(D)RFS after endocrine therapy: a transATAC study/ M. Dowsett, E. Lopez-Knowles, K. Sidhu // *Cancer Res.* - 2011. - 71(3): 4–5. 26.

124. Dowsett, M. Prediction of risk of distant recurrence using the 21-gene recurrence score in node-negative and node-positive postmenopausal patients with

breast cancer treated with anastrozole or tamoxifen: a TransATAC study / M. Dowsett, J. Cuzick, C. Wale, J. Forbes, E.A. Mallon, J. Salter, E. Quinn, A. Dunbier, M. Baum, A. Buzdar, A. Howell, R. Bugarini, F.L. Baehner, S. Shak // *J Clin Oncol.* - 2010. - Apr. - 10;28(11):1829-34.

125. Dowsett, M. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group / M. Dowsett, T.O. Nielsen, R. A'Hern, J. Bartlett, R.C. Coombes, J. Cuzick, M. Ellis, N.L. Henry, J.C. Hugh, T. Lively, L. McShane, S. Paik, F. Penault-Llorca, L. Prudkin, M. Regan, J. Salter, C. Sotiriou, I.E. Smith, G. Viale, J.A. Zujewski, D.F. Hayes; International Ki-67 in Breast Cancer Working Group // *J Natl Cancer Inst.* - 2011. - Nov. - 16:103(22):1656-64.

126. Duggan, D.J. Expression profiling using cDNA microarrays / D.J. Duggan, M. Bittner, Y. Chen, P. Meltzer, J.M. Trent // *Suppl Nat Genet* - 1999. - 21:10-14.

127. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials // *Lancet.* - 2005. - 365:1687–1717.

128. Eifel, P. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000 / P. Eifel, J.A. Axelson , J. Costa , J. Crowley , W.J. Curran, A. Deshler , S. Fulton , C.B. Hendricks , M. Kemeny , A.B. Kornblith , T.A. Louis , M. Markman, R. Mayer, D. Roter // *J Natl Cancer Inst.* - 2001. - Jul. - 4;93(13):979-89.

129. Elston, C.W. Pathological prognostic factors in breast cancer. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up / C.W. Elston, I.O. Ellis // *Histopathology.* - 1991. - 19: 403-410.

130. Eom, Y.H. BCL2 as a Subtype-Specific Prognostic Marker for Breast Cancer/Eom YH, Kim HS, Lee A, Song BJ, Chae BJ.//*J Breast Cancer.* -2016.- Sep.- .9(3):252-260.

131. Espinosa-Bravo, M. Breast conservative surgery after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: comparison of two tumor localization methods / M. Espinosa-Bravo, A. Sao Aviles, A. Esqueva // *Eur J Surg Oncol.* - 2011. - 37: 1038-1043.

132. Esteban, J. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer: multi-gene RT-PCR assay of paraffin-embedded tissue / J. Esteban, J. Baker, M. Cronin // American Society of Clinical Oncology. -2003. - 22:850.
133. Esteva, F.J. Multi-gene RT-PCR assay for predicting recurrence in node negative breast cancer patients — MD Anderson Clinical Validation Study / F.J. Esteva, A.A. Sahin, K. Coombes // Breast Cancer Res Treat.- 2003.- 82:A16.
134. Farmer, P. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis / P. Farmer, H. Bonnefoi, V. Becette, M. Tubiana-Hulin, P. Fumoleau, D. Larsimont, G. Macgrogan, J. Bergh, D. Cameron, D. Goldstein, S. Duss, A.L. Nicoulaz, C. Brisken, M. Fiche, M. Delorenzi, R. Iggo // Oncogene. - 2005. - Jul. - 7; 24(29):4660-71.
135. Fisher, B. Tamoxifen and chemotherapy for lymph node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer / B. Fisher, J. Dignam, N. Wolmark, A. DeCillis, B. Emir, D.L. Wickerham, J. Bryant, N.V. Dimitrov, N. Abramson, J.N. Atkins, H. Shibata, L. Deschenes, R.G. Margolese // J Natl Cancer Inst. - 1997. - Nov. - 19;89(22):1673-82.
136. Fisher, B. Treatment of axillary lymph node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: updated findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project clinical trials/ B. Fisher, J.H. Jeong, S. Anderson, N. Wolmark // J Natl Cancer Inst. - 2004. - Dec. - 15. - 96(24):1823-31.
137. Fu, J. Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis / J. Fu, M. Bian, Q. Jiang, C. Zhang // Mol Cancer Res. - 2007. - 5:1-10. 20.
138. Galimberti, V. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23–01): a phase 3 randomised controlled trial / V. Galimberti, B.F. Cole, S. Zurrada // Lancet Oncol. - 2013. - 14: 297–305.
139. Garber, K. Genomic medicine. Gene expression tests foretell breast cancer's future/Garber K.//Science.- 2004.-Mar.- 19;303(5665):1754-5.
140. Gayathri, N. Adjuvant Chemotherapy Decisions in Clinical Practice for Early-Stage Node-Negative, Estrogen Receptor-Positive, HER2-Negative Breast

Cancer: Challenges and Considerations / N. Gayathri, C.X. Ma // JNCCN. - 2013. - 11(3): 246-251. 20.

141. Gerdes, J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies / J. Gerdes // Semin Cancer Biol. - 1990. - Jun. - 1(3):199-206.

142. Giuliano, A.E. Axillary dissection versus no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis / A.E. Giuliano, K.K. Hunt, K.V. Ballman // JAMA - 2011. - 305: 569–575.

143. Gligorov, J. Prospective Clinical Utility Study of the Use of the 21-Gene Assay in Adjuvant Clinical Decision Making in Women With Estrogen Receptor-Positive Early Invasive Breast Cancer: Results From the SWITCH Study / J. Gligorov, X.B. Pivot, W. Jacot, H.L. Naman, D. Spaeth, J.L. Misset, R. Largillier, J.L. Sautiere, A. de Roquancourt, C. Pomel, P. Rouanet, R. Rouzier, F.M. Penault-Llorca, Francilian Breast Intergroup // Oncologist. - 2015. - Aug. - 20(8):873-9.

144. Gnant, M. Dual inhibition of HER2 in breast cancer treatment / M. Gnant, G.G. Steger // Lancet. - 2012. - Feb. - 18:379(9816):596-8.

145. Gobardhan, P.D. The role of radioactive iodine-125 seed localization in breastconserving therapy following neoadjuvant chemotherapy / P.D. Gobardhan, L.L. de Wall, L. van der Laan, A.J. ten Tije // Ann Oncol. – 2013. - 24(3): 668-673.

146. Goetz, M.P. A two-gene expression ratio of homeobox 13 and interleukin-17B receptor for prediction of recurrence and survival in women receiving adjuvant tamoxifen/Goetz MP1, Suman VJ, Ingle JN, Nibbe AM, Visscher DW, Reynolds CA, Lingle WL, Erlander M, Ma XJ, Sgroi DC, Perez EA, Couch FJ.// Clin Cancer Res.- 2006.- Apr.- 1;12(7 Pt 1):2080-7.

147. Goktas, S. Prognostic role of Aurora-A expression in metastatic colorectal cancer patients / S. Goktas, M. Yildirim, D. Suren // JBUON. - 2014. - 19:686-691.

148. Goldhirsch, A. G. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer / A. Goldhirsch // Annals of Oncology. - 2005. - Oct. – 16(10):1569-83.

149. 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. Goldhirsch, E.P. Winer, A.S. Coates, R.D Gelber. // *Annals of Oncology*. - 2013. - 24(9): 2206-2223.

150. Goldhirsch, A. Strategies for subtypes - dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011 / A. Goldhirsch, W.C. Wood, A.S. Coates // *Ann Oncol*. - 2011. - 22:1736-1747.

151. Goldhirsch, A. Thresholds for therapies: Highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer / A. Goldhirsch // *Ann Oncol*. - 2009. - № 20. - C. 1319-1329.

152. Gonzalez-Angulo, A. M. PI3K Pathway Mutations and PTEN Levels in Primary and Metastatic Breast Cancer /A. M. Gonzalez-Angulo, J. Ferrer-Lozano, K. Stemke-Hale, A. Sahin, S. Liu, J. A. Barrera, O. Burgues, A. M. Lluch, H. Chen, Gabriel N. Hortobagyi, G. B. Mills, F. Meric-Bernstam // *Mol Cancer* - 2011. - Ther - June 10; 1093

153. Graham, K. Gene expression in histologically normal epithelium from breast cancer patients and from cancer-free prophylactic mastectomy patients shares a similar profile / K. Graham , A. de las Morenas , A. Tripathi , C. King , M. Kavanah , J. Mendez , M. Stone , J. Slama , M. Miller , G. Antoine , H. Willers , P. Sebastiani, C.L. Rosenberg // *Br J Cancer*. - 2010. - Apr. - 13;102(8):1284-93.

154. Green, A.R. Identification of key clinical phenotypes of breast cancer using a reduced panel of protein biomarkers / A.R. Green, D.G. Powe, E.A. Rakha, D. Soria, C. Lemetre, C.C. Nolan, F.F. Barros, R.D. Macmillan, J.M. Garibaldi, G.R. Ball, I.O.Ellis // *Br J Cancer*. - 2013. - Oct. - 1;109(7):1886-94.

155. Green, A.R. MYC functions are specific in biological subtypes of breast cancer and confers resistance to endocrine therapy in luminal tumours / A.R. Green, M.A. Aleskandarany, D. Agarwal, S. Elsheikh, C.C. Nolan, M. Diez-Rodriguez, R.D. Macmillan, G.R. Ball, C. Caldas, S. Madhusudan, I.O. Ellis, E.A. Rakha // *Br J Cancer*. - 2016. - Mar.1-12.

156. Guarneri, V. Final results of a phase II randomized trial of neoadjuvant anthracyclinetaxane chemotherapy plus lapatinib, trastuzumab, or both in HER2-positive breast cancer (CHER-LOB trial) / V. Guarneri, A. Frassoldati, A. Bottini // *J Clin Oncol.* - 2011. - 29: a507.

157. Guedj, M. A refined molecular taxonomy of breast cancer / M. Guedj, L. Marisa, A. de Reynies, B. Orsetti, R. Schiappa, F. Bibeau, G. MacGrogan, F. Lerebours, P. Finetti, M. Longy, P. Bertheau, F. Bertrand, F. Bonnet, A.L. Martin, J.P. Feugeas, I. Bièche, J. Lehmann-Che, R. Lidereau, D. Birnbaum, F. Bertucci, H. de Thé, C. Theillet // *Oncogene.* - 2012. - Mar. - 1; 31(9):1196-206.

158. Guiu, S. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement/Guiu S1, Michiels S, André F, Cortes J, Denkert C, Di Leo A, Hennessy BT, Sorlie T, Sotiriou C, Turner N, Van de Vijver M, Viale G, Loi S, Reis-Filho JS.// *Ann Oncol.* – 2012. – Dec. -23(12):2997-3006.

159. Hammond, M.E. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer / M.E. Hammond, D.F. Hayes, M. Dowsett // *J Clin Oncol.* - 2010. - 28(16): 2784–2795.

160. Hammond, M.E. Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer / M.E. Hammond, D.F. Hayes, A.C. Wolff // *J Clin Oncol.* - 2011. - 29: e458.

161. Hammond, ME. American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer / M.E. Hammond, D.F. Hayes, M. Dowsett, D.C. Allred, K.L. Hagerty, S. Badve, P.L. Fitzgibbons, G. Francis, N.S. Goldstein, M. Hayes, D.G. Hicks, S. Lester, R. Love, P.B. Mangu, L. McShane, K. Miller, C.K. Osborne, S. Paik, J. Perlmutter, A. Rhodes, H. Sasano, J.N. Schwartz, F.C. Sweep, S. Taube, E.E. Torlakovic, P. Valenstein, G. Viale, D. Visscher, T. Wheeler, R.B. Williams, J.L. Wittliff, A.C. Wolff // *Arch Pathol Lab Med* - 2010. - 134:907-922.

162. Harold, J. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline: Update on Adjuvant Endocrine Therapy for Women with Hormone Receptor-Positive Breast Cancer / J. Harold, A. A. Burstein // *Journal of clinical oncology*. - 2007. - № 28. - C. 3784-3796.

163. Harris, L.N. Use of Biomarkers to Guide Decisions on Adjuvant Systemic Therapy for Women With Early-Stage Invasive Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline / L.N. Harris, N. Ismaila, L.M. McShane, F. Andre, D.E. Collyar, A.M. Gonzalez-Angulo, E.H. Hammond, N.M. Kuderer, M.C. Liu, R.G. Menck, C. Van Poznak, R.C. Bast, D.F. Hayes ; American Society of Clinical Oncology // *J Clin Oncol*. - 2016. - Apr 1;34(10):1134-50.

164. Hassett, M.J. Adoption of gene expression profile testing and association with use of chemotherapy among women with breast cancer / M.J. Hassett, S.M. Silver, M.E. Hughes, D.W. Blayney, S.B. Edge, J.G. Herman, C.A. Hudis, P.K. Marcom, J.E. Pettinga, D. Share, R. Theriault, Y.N. Wong, J.L. Vandergrift, J.C. Niland, J.C. Weeks // *J Clin Oncol*. - 2012. - Jun. - 20:30(18):2218-26.

165. Hennessy, B.T. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics / B.T. Hennessy, A.M. Gonzalez-Angulo, K. Stemke-Hale // *Cancer Res*. - 2009. - 69: 4116–4124.

166. Hepp, P. Association of CA27.29 and Circulating Tumor Cells Before and at Different Times After Adjuvant Chemotherapy in Patients with Early-stage Breast Cancer - The SUCCESS Trial / P. Hepp, U. Andergassen, B. Jäger, E. Trapp, M. Alunni-Fabbroni, T.W. Friedl, N. Hecker, R. Lorenz, P. Fasching, A. Schneeweiss, T. Fehm, W. Janni, B. Rack // *Anticancer Res*. - 2016. - Sep. - 36(9):4771-6.

167. Herschkowitz, J.I. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors / J.I. Herschkowitz, K. Simin, V.J. Weigman, I. Mikaelian, J. Usary, Z. Hu, K.E. Rasmussen, L.P. Jones, S. Assefnia, S. Chandrasekharan, M.G. Backlund, Y. Yin, A.I. Khramtsov, R. Bastein, J. Quackenbush, R.I. Glazer, P.H. Brown, J.E. Green, L. Kopelovich, P.A.

Furth, J.P. Palazzo, O.I. Olopade, P.S. Bernard, G.A. Churchill, T. Van Dyke, C.M. Perou // *Genome Biol.* - 2007. - 8(5):R76.

168. Higgins, M.J. What is the current status of ovarian suppression/ablation in women with premenopausal early-stage breast cancer? / M.J. Higgins // *Curr Oncol Rep.* - 2009. - № 11. - C. 45-50.

169. Hiroko Asanuma, Survivin Expression Is Regulated by Coexpression of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 and Epidermal Growth Factor Receptor via Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT Signaling Pathway in Breast Cancer Cells / Hiroko Asanuma, Toshihiko Torigoe.// *Cancer Res.* -2005. – 65: 110-118.

170. Holmes, D.R. Oncoplastic approaches to breast conservation/Holmes D.R., Schooler W., Smith R.// *International Journal of Breast Cancer.* -2011.-P.1-16.

171. Holysz, H. Telomerase as a useful target in cancer fighting-the breast cancer case/Holysz H, Lipinska N, Paszel-Jaworska A, Rubis B.//*Tumour Biol.*- 2013.- Jun.-34(3):1371-80.

172. Hopton, D. Observer variation in histological grading of breast cancer / D.S. Hopton, J. Thorogood, A.D. Clayden, D. MacKinnon // *European Journal of Surgical Oncology.* - 1989. - 15:21-3. 35.

173. Hornberger, J. US Insurance Program's Experience With a Multigene Assay for Early-Stage Breast Cancer / J. Hornberger, R. Chien, K. Krebs, L. Hochheiser // *J Oncol Pract.* - 2011. - May. - 7(3):38-45.

174. Houssami, N. The association of surgical margins and local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy: ameta-analysis/ Houssami N., Macaskill P., Marinovich M.L. // *Annals of surgical oncology.* - 2014. -21:717–730.

175. Hu, Z. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms / Z. Hu, Fan C, D.S. Oh, J.S. Marron, X. He, B.F. Qaqish, C. Livasy, L.A. Carey, E. Reynolds, L. Dressler, A. Nobel, J. Parker, M.G. Ewend, L.R. Sawyer, J. Wu, Y. Liu, R . Nanda, M. Tretiakova, A. Ruiz Orrico, D. Dreher, J.P. Palazzo, L. Perreard, E. Nelson, M. Mone, H. Hansen, M. Mullins, J.F. M.J.

Quackenbush, O.I. Olopade, P.S. Bernard, C.M. Perou // *BMC Genomics*. - 2006. -Apr. - 27; 7:96.

176. Hugh, J. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an Immunohistochemical definition in the BCIRG 001 Trial / J. Hugh, J. Hanson, M.C. Cheang // *J Clin Oncol*. - 2009. - 27: 1168–1176.

177. Hughes, J.H. A Multi-site validation trial of radioactive seed localization as an alternative to wire localization / J.H. Hughes, M.C. Mason, R.J. Gray // *Breast J*. - 2008. - 14: 153-157.

178. Jalava, P.K. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index // *Histopathology*. - 2006. - № 48. - C. 674–682.

179. Jeevan, R. Reoperation rates after breast conserving surgery for breast cancer among women in England: retrospective study of hospital episode statistics/ Jeevan R., Cromwell D. A., Trivella M. // *British medical journal*.- 2012.- 345.

180. Jemal, A.S. Cancer statistics / A.S. Jemal // *CA Cancer J Clin*. - 2007. - № 57. - C. 43-66.

181. Jeschke, U. Determination of MUC1 in sera of ovarian cancer patients and in sera of patients with benign changes of the ovaries with CA15-3, CA27.29, and PankoMab / U. Jeschke, I. Wiest, A.L. Schumacher, M. Kupka, B. Rack, R. Stahn, U. Karsten, D. Mayr, K. Friese, D. Dian // *Anticancer Res*. - 2012. May. -32(5):2185-9.

182. Jobard, E. A serum nuclear magnetic resonance-based metabolomic signature of advanced metastatic human breast cancer / E. Jobard, C. Pontoizeau, B.J. Blaise, T. Bachelot, B. Elena-Herrmann, O. A. Trédan // *Cancer Lett*. - 2014. - Feb. - 1; 343(1):33-41.

183. Jones, S. Personalized genomic analyses for cancer mutation discovery and interpretation /S. Jones, V. Anagnostou, K. Lytle, S. Parpart-Li, M. Nesselbush, D. R. Riley, M. Shukla, B. Chesnick, M. Kadan, E. Papp, K. G. Galens, D. Murphy, T. Zhang, L. Kann, M. Sausen, S. V. Angiuoli, L. A. Diaz Jr., V. E. Velculescu // *Science Translational Medicine*. - 2015. - Vol. 7(283):283-53.

184. Kalinsky, K. Increased expression of tumor proliferation genes in Hispanic women with early-stage breast cancer / K. Kalinsky, E.A. Lim, E. Andreopoulou, A.M. Desai, Z. Jin, Y. Tu, H. Hibshoosh, A. Wang, H. Greenlee, K.D. Crew, M. Maurer, J.A. Sparano, D.L. Hershman // *Cancer Invest.* 2014. - Nov. - 32(9):439-44.

185. Kalogeraki, A. P53 expression in patients with malignant and benign breast diseases / A. Kalogeraki, J. Panayiotides, D. Tamiolakis, M. Tzardi, V. Chaniotis, G. Chalkiadakis, J. Melissas, D. Stifitsis, P. Kanavaros, G.S. Delides // *Anticancer Res.* - 2000. - May. - Jun. - 20(3A):1801-5.

186. Kappes, H. PTEN expression in breast and endometrial cancer: correlations with steroid hormone receptor status / Kappes H., Goemann C., Bamberger A.M., Löning T., Milde-Langosch K. // *Pathobiology.* - 2001. – 69: 136-42.

187. Kaviani, A. From radical mastectomy to breast-Conserving therapy and oncoplastic breast surgery: a narrative review comparing oncological result, cosmetic outcome, quality of life, and health economy/ Kaviani A., Sodagari N., Sheikhabaei S. // *International Scholarly Research Notices Oncology.* - 2013. URL:<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/742462/>.

188. Kechagioglou, P. Tumor suppressor PTEN in breast cancer: heterozygosity, mutations and protein expression / P. Kechagioglou, R.M. Papi, X. Provatopoulou, E. Kalogera, E. Papadimitriou, P. Grigoropoulos, A. Nonni, G. Zografos, D.A. Kyriakidis, A. Gounaris // *Anticancer Res.* - 2014. - Mar. - 34(3):1387-400.

189. Kim, M.Y. Predicting local recurrence following breast-conserving treatment: parenchymal signal enhancement ratio (SER) around the tumor on preoperative MRI / M.Y. Kim , N. Cho , H.R. Koo , B.L. Yun , M.S. Bae , E.K. Chie , W.K. Moon // *Acta Radiol.* - 2013. - Sep. - 54(7):731-8.

190. Knudsen, E.S. Targeting the RB-pathway in cancer therapy / E.S. Knudsen, J.Y. Wang // *Clin Cancer Res.* - 2010. - Feb 15;16(4):1094-9.

191. Koboldt, D.C. VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing/ Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK. // *Genome Res.* - 2012. - Mar. - 22(3):568-76

192. Komorowski, A.L. Necrotic complications after nipple- and areolasparing mastectomy / A.L. Komorowski, V. Zanini, L. Regolo, A. Carolei, W.M. Wysocki, A. Costa // *World J Surg.* - 2006. - 30(8): 1410.
193. Kontzoglou, K. Correlation between Ki67 and breast cancer prognosis / K. Kontzoglou, V. Palla, G. Karaolanis, I. Karaiskos, I. Alexiou, I. Pateras, K. Konstantoudakis, M. Stamatakos // *Oncology.* - 2013. - 84(4):219-25.
194. Koutselini, H. p53 expression in cytologic specimens from benign and malignant breast lesions /Koutselini H1, Malliri A, Field JK, Spandidos DA.//
195. Kreike, B. Continuing risk of ipsilateral breast relapse after breast-conserving therapy at long-term follow-up/ Kreike B., Hart A.A., Velde V.D. // *International journal of radiation oncology Biology Physics.*- 2008. - 71(4) P. 1014-21.
196. Krekel, N.M. A comparison of three methods for nonpalpable breast cancer excision / N.M. Krekel, B.M. Zonderhuis, H.B. Stockmann // *Eur J Surg Oncol.* - 2011. - 37: 109-115.
197. Krekel, N.M. Ultrasoundguided breast-sparing surgery to improve cosmetic outcomes and quality of life. A prospective multicentre randomized controlled clinical trial comparing ultrasound-guided surgery to traditional palpation guided surgery (COBALT trial) / N.M. Krekel, B.M. Zonderhuis, H.W.H. Scheurs // *BMC Surg.* - 2011. - 16: 11-18.
198. Lee, H.J. Clinicopathologic Significance of the Intratumoral Heterogeneity of HER2 Gene Amplification in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated With Adjuvant Trastuzumab / H.J. Lee , J.Y. Kim , S.Y. Park, I.A. Park, I.H. Song, J.H. Yu, J.H. Ahn, G. Gong // *Am J Clin Pathol.* - 2015. - Oct. - 144(4):570-8.
199. Lelle, R.J. In situ determination of the Ki-67 growth fraction (Ki-67 GF) in human tumors (studies in breast cancer) / R.J. Lell // *Acta Histochem Suppl.* - 1990. - 39:109-24.
200. Leone, F. Detection of breast cancer cell contamination in leukapheresis product by real-time quantitative polymerase chain reaction / F. Leone, E. Perissinotto, A. Viale, G. Cavalloni, S. Taraglio, A. Capaldi, W. Piacibello, B. Torchio, M. Aglietta // *Bone Marrow Transplant.* - 2001. - Mar. - 27(5):517-23.

201. Leroy, C. Anticipating mechanisms of resistance to PI3K inhibition in breast cancer: a challenge in the era of precision medicine / C. Leroy, R.J. Amante, M. Bentires-Alj // *Biochem. Soc. Trans.* - 2014. - Aug.1. 42:4 733-741
202. Levitan, D. Authoritative updates for oncologists and hematologists from the 2011 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Breast Cancer Symposium. ASCO Breast: No Survival Advantage for Mastectomy vs Breast Conservation Therapy / D. Levitan // *ASCO 2011 Breast Cancer Symposium, Breast Cancer, Oncology Journal.* - 2011. - Sep. - 09.
203. Li, B.J. Expression correlation of Ki67 to P53,VEGF,and C-erbB-2 genes in breast cancer and their clinical significances/ Li B.J., Zhu Z.H.// *Ai Zheng.*- 2004.- 23:1176-1179.
204. Li, R. A Gene Regulatory Program in Human Breast Cancer / R. Li, J. Campos, J. Iida // *Genetics.* - 2015. - Dec. - 201(4):1341-8.
205. Li, S. Predicting breast cancer recurrence following breast-conserving therapy: a single-institution analysis consisting of 764 Chinese breast cancer cases/ Li S., Yu K.D., Fan L. // *Annals surgical oncology.* - 2011. - 18(9):2492-2499.
206. Li, Z. Cyclin D1 integrates estrogen-mediated DNA damage repair signaling / Z. Li , K. Chen , X. Jiao, C. Wang, N.E. Willmarth , M.C. Casimiro, W. Li, X. Ju, S.H. Kim, M.P. Lisanti, J.A. Katzenellenbogen, R.G. Pestell // *Cancer Res.* - 2014. - Jul. - 15;74(14):3959-70.
207. Liao, Ning. Effect of inhibiting autophagy induced by PTEN loss on intrinsic breast cancer resistance to trastuzumab therapy / N. Liao, G. Zhang, S. An, X. R. Li, K. Wang, J. Zu, C. Ren, L. Wen, H. Lv // *J Clin Oncol* - 2015. - 33
208. Lovrics, P.J. A multicentered, randomized, controlled trial comparing radio guided seed localization to standard wire localization for nonpalpable invasive and in situ breast carcinomas / P.J. Lovrics, C.H. Goldsmith, N. Hodgson // *Ann Surg Oncol.* - 2011. - 18: 3407-3414.
209. Lu, L. Computational identification of potential microRNA network biomarkers for the progression stages of breast cancer / L. Lu, Y. Li, S. Li // *Int J Data Min Bioinform.*- 2011.- 5(5):519-31.

210. Luna, L.G. Better Paraffin Sections with the Aid of Vacuum/ L.G. Luna and E.F. Ballou, M.T. (ASCP)// *Histopathology Laboratories, Armed Forces Institute of Pathology.*- 1972. -Washington.- January. - II(1):11.

211. Ma, X.J. The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer/ Ma XJ, Hilsenbeck SG, Wang W, Ding L, Sgroi DC, Bender RA, Osborne CK, Allred DC, Erlander MG.//*J Clin Oncol.*- 2006 .-Oct .-1;24(28):4611-9.

212. Magloire Ketcha Wanda, G.J. Regulation of CD1, Ki-67, PCNA mRNA expression, and Akt activation in estrogen-responsive human breast adenocarcinoma cell line, MCF-7 cells, by griffonianone C, an isoflavone derived from *Millettia griffoniana* / G.J. Magloire Ketcha Wanda, D. Njamen, F.M. Tagatsing, E. Yankep, G. Vollmer // *Pharmaceutical biology.* - 2011. - Apr 49(4):341-7.

213. Mansour, E.G. Efficacy of adjuvant chemotherapy in high-risk node-negative breast cancer. An intergroup study / E.G. Mansour , R. Gray, A.H. Shatila , C.K. Osborne , D.C. Tormey , K.W. Gilchrist , M.R. Cooper , G. Falkson // *N Engl J Med.* - 1989. - Feb. - 23;320(8):485-90.

214. Mao, X.Y. Increased N-myc downstream-regulated gene 1 expression is associated with breast atypia-to-carcinoma progression / Mao X.Y., Fan C.F., Wei J., Liu C., Zheng H.C., Yao F., Jin F. // *Tumour Biol.* - 2011. - 32: 1271-1276.

215. Marques, A.R. Detection of human mammaglobin mRNA in serial peripheral blood samples from patients with non-metastatic breast cancer is not predictive of disease recurrence / A.R. Marques , E. Teixeira , J. Diamond , H. Correia , S. Santos , L. Neto , M. Ribeiro , Miranda A., J.L. Passos-Coelho // *Breast Cancer Res. Treat.* - 2009. - v.114. - №2. - p. 223-32.

216. Massarweh, S. Mechanisms of tumor regression and resistance to estrogen deprivation and fulvestrant in a model of estrogen receptor-positive, HER-2/ neu-positive breast cancer / S. Massarweh, C.K. Osborne, S. Jiang // *Cancer Res.* - 2006. - 66: 8266–8273.

217. Maxwell, A. E. Results of a randomized trial to increase breast and cervical cancer screening among Filipino American women / A.E. Maxwell, R. Bastani, P. Vida, U.S. Warda // *Prev Med.* - 2003. - Aug;37(2):102-9.

218. McDonnell, T.J. bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation/ McDonnell TJ, Deane N, Platt FM, Nunez G, Jaeger U, McKearn JP, Korsmeyer SJ.// *Cell.* - 1989. - Apr. - 7;57(1):79-88.

219. McDonnell,T.J. Cell division versus cell death: a functional model of multistep neoplasia /McDonnell TJ.// *Mol Carcinog.*- 1993.-8(4):209-13

220. Merkel, D.E. Electrophoretic analysis of 248 clinical breast cancer specimens for p-glycoprotein over expression for gene amplification /D.E. Merkel, S.A.W. Fuqua, A.K.Tandon// *J Clin Oncol* - 1989. 7:1129-1136

221. Mertins, P. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer / P. Mertins, D.R. Mani, K.V. Ruggles, M.A. Gillette, K.R. Clauser, P. Wang, X. Wang, J.W. Qiao, S. Cao, F. Petralia, E. Kawaler, F. Mundt, K. Krug, Z. Tu, J.T. Lei, M.L. Gatz, M. Wilkerson, C.M. Perou, V. Yellapantula, K.L. Huang, C. Lin, M.D. McLellan, P. Yan, S.R. Davies, R.R. Townsend, S.J. Skates, J. Wang, B. Zhang, C.R. Kinsinger, M. Mesri, H. Rodriguez, L. Ding, A.G. Paulovich, D. Fenyö, M.J. Ellis, S.A. Carr // *NCI CPTAC. Nature.* - 2016. - Jun. - 2;534(7605):55-62.

222. Milde-Langosch, K. Overexpression of the p16 cell cycle inhibitor in breast cancer is associated with a more malignant phenotype / K. Milde-Langosch , A.M. Bamberger , G. Rieck , B. Kelp , T. Löning // *Breast Cancer Res Treat.* - 2001. - May. - 67(1):61-70.

223. Miyoshi, Y. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers / Y. Miyoshi, K. Iwao, C. Egawa, S. Noguchi // *Int J Cancer.* - 2001. - 92:370-373.

224. Mook, S. Calibration and discriminatory accuracy of prognosis calculation for breast cancer with the online Adjuvant! program: a hospital-based retrospective cohort study / S. Mook, M.K. Schmidt, E.J. Rutgers // *Lancet Oncol.* – 2009. - 10: 1070–1076.

225. Mouridsen, H.T. BIG 1–98: a randomized double-blind phase III study evaluating letrozole and tamoxifen given in sequence as adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with receptor-positive breast cancer. San Antonio: In San Antonio Breast Cancer Symposium.-2008.

226. Mullins, M. Agreement in breast cancer classification between microarray and quantitative reverse transcription PCR from fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissues / M. Mullins, L. Perreard, J.F. Quackenbush, N. Gauthier, S. Bayer, M. Ellis, J. Parker, C.M. Perou, A. Szabo, P.S. Bernard // Clin Chem. - 2007. - Jul. - 53(7):1273-9.

227. Muss, H.B. Adjuvant chemotherapy in older women with early-stage breast cancer / H.B. Muss // N Engl J Med. - 2009. - № 360. - C.2055-65.

228. Nadler, Y. Expression of Aurora A (but not Aurora B) is predictive of survival in breast cancer / Y. Nadler, R.L. Camp, C. Schwartz, D.L. Rimm, H.M. Kluger, Y. Kluger // Clin Cancer Res. - 2008. - 14:4455–62.

229. Nadler, Y. Growth factor receptor-bound protein-7 (Grb7) as a prognostic marker and therapeutic target in breast cancer / Y. Nadler, A.M. González, R.L. Camp, D.L. Rimm, H.M. Kluger, Y. Kluger // Ann Oncol. - 2010. - Mar. - 21(3):466-73.

230. Nagai, M.A. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients / Nagai M.A., Gerhard R., Fregnani J.H., Nonogaki S., Rierger R.B., Netto M.M., Soares F.A. // Breast Cancer Res. Treat. – 2011. – 126: 1-14.

231. Nassar, A. Ki-67 expression in sclerosing adenosis and adjacent normal breast terminal ductal lobular units: a nested case-control study from the Mayo Benign Breast Disease Cohort / A. Nassar, T.L. Hoskin, M.L. Stallings-Mann, A.C. Degnim, D.C. Radisky, M.H. Frost, R.A. Vierkant, L.C. Hartmann, D.W. Visscher // Breast Cancer Res. Treat. - 2015. - May. - 151(1):89-97.

232. NCCN <https://www.nccn.org/evidenceblocks/Default.aspx>

233. Ne, D. Adjuvant therapies for premenopausal women with endocrine-responsive disease / D. Ne // Breast.- 2009.- №18.- C.15.

234. Nielsen, T.O. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma / T.O. Nielsen, F.D. Hsu, K. Jensen, M.

Cheang, G. Karaca, Z. Hu, T. Hernandez-Boussard, C. Livasy, D. Cowan, L. Dressler, L.A. Akslen, J. Ragaz, A.M. Gown, C.B. Gilks, M. van de Rijn, C.M. Perou // *Clin Cancer Res.* - 2004. - Aug. - 15;10(16):5367-74.

235. Ning, L. Inhibition of autophagy induced by PTEN loss promotes intrinsic breast cancer resistance to trastuzumab therapy / L. Ning, Z. Guo-Chun, A. Sheng-Li, L. Xue-Rui, W. Kun, Z. Jian, R. Chong-Yang, W. Ling-Zhu, L. Hai-Tong // *Tumour Biol.* - 2016. - Apr. - 37(4):5445-54.

236. Oakman, C. Uncovering the metabolomic fingerprint of breast cancer / C. Oakman, L. Tenori, L. Biganzoli, L. Santarpia, S. Cappadona, C. Luchinat, A. Di Leo // *Int J Biochem Cell Biol.* - 2011. - Jul. - 43(7):1010-20.

237. Obr, A.E. The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer / Obr A.E., Edwards D.P. // *Mol Cell Endocrinol.* – 2012. - Jun. - 24;357(1-2):4-17.

238. Oh, D.S. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers / D.S. Oh, M.A. Troester, J. Usary // *J Clin Oncol.* – 2006. - 24: 1656–1664.

239. Olivotto, I.A. Population-based validation of the prognostic model ADJUVANT! for early breast cancer / I.A. Olivotto // *J Clin Oncol.* - 2008. - № 20. - C. 2716-25.

240. Oltvai, Z.N. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death / Z.N. Oltvai, X.M. Yin, D.J. Veis-Novack, G.P. Linette, S.J. Korsmeyer // *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* - 1994.- 59:387-93.

241. Onitilo, A.A. Survival comparisons for breast conserving surgery and mastectomy revisited: community experience and the role of radiation therapy/ Onitilo A.A., Engel J.M., Stankowski R.W. // *Clinical medicine and research.* - 2015. – 13(2):65-73.

242. Ooka, M. Bone marrow micro metastases detected by RT-PCR for mammaglobin can be an alternative prognostic factor of breast cancer / M. Ooka, Y. Tamaki, I. Sakita, Y. Fujiwara, H. Yamamoto, Y. Miyake, M. Sekimoto, M. Ohue, Y.

Sugita, Y. Miyoshi, N. Ikeda, S. Noguchi, M. Monden // *Breast Cancer Res Treat.* - 2001. - May. - 67(2):169-75.

243. Page-McCaw, A. Distinct functions for the catalytic and hemopexin domains of a *Drosophila* matrix metalloproteinase/Page-McCaw A., Glasheen B.M., Kabra A.T. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2009. - Feb. - 24;106(8):2659-64.

244. Paik, S. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer / S. Paik, G. Tang, S. Shak // *J Clin Oncol.* - 2006. - 24: 3726– 3734.

245. Paik, S. Multi-gene RT-PCR assay for predicting recurrence in node negative breast cancer patients: NSABP studies B-20 and B14 2003 / S. Paik, S. Shak, G. Tang // *New England Journal of Medicine (NEJM).* - 2004. - 351;27:2817.

246. Pape-Zambito, D. Identifying a highly-aggressive DCIS subgroup by studying intra-individual DCIS heterogeneity among invasive breast cancer patients / D. Pape-Zambito, Z. Jiang, H. Wu, K. Devarajan, C.M. Slater, K.Q. Cai, A. Patchefsky, M.B. Daly, X. Chen // *PLoS One.* - 2014. - Jun 30;9(6):e100488.

247. Park, S. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry / Park S1, Koo JS, Kim MS, Park HS, Lee JS, Lee JS, Kim SI, Park BW // *Breast.* – 2012. – Feb. -21(1):50-7.

248. Park, S. Expression of androgen receptors in primary breast cancer / S. Park, J. Koo, H.S. Park // *Ann Oncol.* - 2010. - 21: 488–492.

249. Park, S. The impact of a focally positive resection margin on the local control in patients treated with breast-conserving therapy / S. Park, H.S. Park, S.I. Kim // *J Clin Oncol.* - 2011. - 5:600-608.

250. Parker, J.S. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes / J.S. Parker, M. Mullins, M.C. Cheang, S. Leung, D. Voduc, T. Vickery, S. Davies, C. Fauron, X. He, Z. Hu, J.F. Quackenbush, I.J. Stijleman, J. Palazzo, J.S. Marron, A.B. Nobel, E. Mardis, T.O. Nielsen, M.J. Ellis, C.M. Perou, P.S. Bernard // *J Clin Oncol.* - 2009. - Mar. - 10; 27(8):1160-7.

251. Pathak, T.B. Estrogen and progesterone receptor expression in breast carcinoma / Pathak T.B., Bashyal R., Pun C.B., Shrestha S., Bastola S., Neupane S., Poudel B.R. // *Journal of Pathology of Nepal*. – 2000. – 1: 100-103.
252. Pauletti, G. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization / G. Pauletti, W. Godolphin, M.F. Press, D.J. Slamon // *Oncogene* - 1996. - Jul 4;13(1):63-72.
253. Peasgood, T. Health-state utility values in breast cancer / T. Peasgood, S.E. Ward, J. Brazier // *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* - 2010. - Oct. - 10(5):553-66.
254. Peihong, S. Expression of nm23, MMP-2, TIMP-2 in breast neoplasm in Zhengzhou Center Hospital, China/ Peihong S1, Perry F.// *Ethiop Med J.* – 2007.- Jan.- 45(1):79-83.
255. Perez, D. TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K / Perez D, White E.// *Mol Cell.*- 2000.- Jul.-6(1):53-63.
256. Perez, E.A. Four-year follow-up of trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor 2- positive breast cancer: joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B- 31 / E.A. Perez, E.H. Romond, V.J. Suman // *J Clin Oncol.* - 2011. - 29: 3366–3373.
257. Perou, C.M. Molecular portraits of human breast tumours // C.M. Perou, T. Sørli, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.L. Børresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein // *Nature.* – 2000. - Aug. - 17; 406(6797):747-52.
258. Peurala, E. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer / E. Peurala, P. Koivunen, K.M. Haapasaari, R. Bloigu, A. Jukkola-Vuorinen // *Breast Cancer Res.* - 2013. - Jan. - 21;15(1).
259. Prat, A. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol.* 2010; 5: 5–23. 6. Canello G. Progesterone receptor loss identifies Luminal B

breast cancer subgroups at higher risk of relapse / A. Prat, C.M. Perou // *Annals of Oncology*. - 2013. - 24: 661–668.

260. Prat, A. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer / A. Prat, J. S. Parker, O. Karginova, C. Fan, C. Livasy, J. I. Herschkowitz, X. He, C. M. Perou // *Breast Cancer Res*. - 2010. - 12:R68.

261. Prat, A. The combination of letrozole and trastuzumab as first or second-line biological therapy produces durable responses in a subset of HER2 positive and ER positive advanced breast cancers / A. Prat, P.K. Marcom, C. Isaacs, L. Harris // *Breast Cancer Res Treat*. - 2007. - 102: 43–49.

262. Press, M.J. HER2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas / M.J. Press, L. Bernstein, P.A. Thomas // *J.Clin.Oncol*. - 1997. - 15:2894–2904.

263. Qin, J. Association between the STK15 polymorphisms and risk of cancer: a meta-analysis / J. Qin, X.F. He, W. Wei, Z.Z. Liu, J.J. Xie, W. Wang, Y.P. Du, Y. Chen, H.Q. Si // *Mol Genet Genomics*. - 2015. - Feb. - 290(1):97-114.

264. Qin, W.W. Synthesis and biological evaluation of 2,4-diaminopyrimidines as selective Aurora A kinase inhibitors / W.W. Qin, C.Y. Sang, L.L. Zhang, W. Wei, H.Z. Tian, H.X. Liu, S.W. Chen, L. Hui // *Eur J Med Chem*. - 2015. - May. - 5;95:174-84.

265. Radisky, D. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context / Radisky D., Hagios C., Bissell M. // *Semin. Cancer Biol*. - 2001. - 11: 87–95.

266. Raftery, J. Possible net harms of breast cancer screening: updated modelling of Forrest report / J. Raftery, M. Chorozoglou // *BMJ*. - 2011. - Dec. - 8;343:d7627.

267. Rakha, E.A. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype / E.A. Rakha, M.E. El-Sayed, A.R. Green // *J Clin Oncol*. - 2007. - 25: 4772–4778.

268. Ranade, K.J. Expression of survivin and p53 proteins and their correlation with hormone receptor status in Indian breast cancer patients / K.J. Ranade, A.V.

Nerurkar , M.D. Phulpagar, N.V. Shirsat // Indian J Med Sci. - 2009. - Nov. - 63(11):481-90.

269. Ravdin, P.M. Computer program to assist in making decisions about adjuvant therapy for women with early breast cancer / P.M. Ravdin // Breast. - 2006. - № 20. - C. 980-91.

270. Ravdin, P.M. Is Her2 of value in identifying patients who particularly benefit from anthracyclines during adjuvant therapy? A qualified yes / P.M. Ravdin // J Natl Cancer Inst Monogr. - 2001. - (30):80-4

271. Reis-Filho, J.S. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction / J.S. Reis-Filho, L. Pusztai // Lancet - 2011. - 378:1812-1823.

272. Ren, J. MYC overexpression and poor prognosis in sporadic breast cancer with BRCA1 deficiency / J. Ren, F. Jin, Z. Yu, L. Zhao, L. Wang, X. Bai, H. Zhao, W. Yao, X. Mi, E. Wang // Tumour Biol. - 2013. - Dec. - 34(6):3945-58.

273. Ross, J.S. HER2/neu gene and protein in breast cancer/ J.S. Ross, J.A. Fletcher // American Journal of Clinical Pathology - 1999. - 112 53–67.

274. Ross, J.S. The HER2/neu Oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy/ J.S. Ross, J.A. Fletcher // Stem Cells – 1998. - 16. 413–428.

275. Rouzier, R. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy / R. Rouzier, C.M. Perou, W.F. Symmans // Clin Cancer Res. - 2005. - 11: 5678–5685.

276. Royce, M.E. STK15/Aurora-A expression in primary breast tumors is correlated with nuclear grade but not with prognosis / M.E. Royce, W. Xia, A.A. Sahin, H. Katayama, D.A. Johnston, G. Hortobagyi, S. Sen, M.C. Hung // Cancer. - 2004. - 100:12.

277. Roy-Chowdhuri, S. Multigene Clinical Mutational Profiling of Breast Carcinoma Using Next-Generation Sequencing / S. Roy-Chowdhuri, D. de Melo Gagliato, M. J. Routbort , K. P. Patel, R. R. Singh, R. Broaddus, A. J. Lazar, A. Sahin MD, R. H. Alvarez, S. Moulder, J. J. Wheler, F. Janku, A. M. Gonzalez-Angulo, M.

Chavez-MacGregor, Vicente Valero, N. T. Ueno, G. Mills, J. Mendelsohn, H. Yao, K. Aldape, R. Luthra, F. Meric-Bernstam // *Am J Clin Pathol* - 2015. - Nov 1. 144:5 713-721

278. Rudas, M. Cyclin D1 expression in breast cancer patients receiving adjuvant tamoxifen-based therapy / M. Rudas, M. Lehnert, A. Huynh, R. Jakesz, C. Singer, S. Lax, W. Schippinger, O. Dietze, R. Greil, W. Stiglbauer, W. Kwasny, R. Grill, M. Stierer, M.F. Gnant, M. Filipits; Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group // *Clin Cancer Res.* - 2008. - Mar. - 15;14(6):1767-74.

279. Ryan, B.M. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1 / Ryan B.M., Konecny G.E., Kahlert S., Wang H.J., Untch M., Meng G., Pegram M.D., Podratz K.C., Crown J., Slamon D.J., Duffy M.J. // *Ann. Oncol.* - 2006. - 17: 597-604.

280. Sacchini, V.S. Nipple-sparing mastectomy for breast cancer and risk-reducing surgery: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience / V.S. Sacchini, P. de Alcantara Filho, D. Capko, J.M. Barry, M. Morrow // *Ann Surg Oncol.* - 2011. - 18(11): 3117-22.

281. Sah, N.K. Effect of downregulation of survivin expression on radiosensitivity of human epidermoid carcinoma cells/Sah NK, Munshi A, Hobbs M, Carter BZ, Andreeff M, Meyn RE.// *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*- 2006.- Nov.- 1;66(3):852-9.

282. Sangen, M.J. Prognosis following local recurrence after breast conserving treatment in young women with early breast cancer/ Sangen M.J., Poortmans P.M., Scheepers S.W. // *European journal of surgical oncology.* - 2013. - 39(8):892-898.

283. Santamaría, I. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas / I. Santamaría, G. Velasco, M. Cazorla, A. Fueyo, E. Campo, C. López-Otín // *Cancer Res.* - 1998. - Apr. - 15;58(8):1624-30.

284. Santisteban, M. Ki67: a time-varying biomarker of risk of breast cancer in atypical hyperplasia / M. Santisteban, C. Reynolds, E.G. Barr Fritcher, M.H. Frost, R.A. Vierkant, S.S. Anderson, A.C. Degnim, D.W. Visscher, V.S. Pankratz, L.C. Hartmann // *Breast Cancer Res. Treat.* - 2010. - Jun. - 121(2):431-7.

285. Saunus, J.M. Integrated genomic and transcriptomic analysis of human brain metastases identifies alterations of potential clinical significance / J.M. Saunus, M.C. Quinn, A.M. Patch, J.V. Pearson, P.J. Bailey, K. Nones, A.E. McCart Reed, D. Miller, P.J. Wilson, F. Al-Ejeh, M. Mariasegaram, Q. Lau, T. Withers, R.L. Jeffree, L.E. Reid, L. Da Silva, A. Matsika, C.M. Niland, M.C. Cummings, T.J. Bruxner, A.N. Christ, I. Harliwong, S. Idrisoglu, S. Manning, C. Nourse, E. Nourbakhsh, S. Wani, M.J. Anderson, J.L. Fink, O. Holmes, S. Kazakoff, C. Leonard, F. Newell, D. Taylor, N. Waddell, S. Wood, Q. Xu, K.S. Kassahn, V. Narayanan, N.A. Taib, S.H. Teo, Y.P. Chow, kConFab, P.S. Jat, S. Brandner, A.M. Flanagan, K.K. Khanna, G. Chenevix-Trench, S.M. Grimmond, P.T. Simpson, N. Waddell, S.R. Lakhani // *J Pathol.* - 2015. - Nov. - 237(3):363-78.

286. Schneider, L. Gene and protein expression of p53 and p21 in fibroadenomas and adjacent normal mammary tissue / L. Schneider, G. Branchini, R. Cericatto, E. Capp, I.S. Brum // *Endocrine.* - 2009. - Feb. - 35(1):118-22.

287. Scholzen, T. The Ki-67 protein: from the known and the unknown / T. Scholzen, J. Gerdes // *J Cell Physiol.* - 2000. - Mar. - 182(3):311-22.

288. Schor, S. Phenotypic and genetic alterations in mammary stroma: implications for tumour progression / S. Schor, A. Schor // *Breast Cancer Res.* - 2001. - 3:373–379.

289. Senkus, E. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up/ Senkus E., Kyriakides S., Penault-Llorca F. // *Annals of oncology.* - 2013. - 26: 8-30.

290. Seruga, B.T. Up-front use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for breast cancer: the emperor has no clothes / B.T. Seruga // *J Clin Oncol.* - 2009. - № 27. - C. 840-842.

291. Shackney, S. E. Common Patterns of Genetic Evolution in Human Solid Tumors / S. E. Shackney, T. V. Shankey // *Cytometry.* - 1997. - 29:1–27.

292. Shan, M. P16 and p53 play distinct roles in different subtypes of breast cancer / Shan M, X. Zhang, X. Liu, Y. Qin, T. Liu, Y. Liu, J. Wang, Z. Zhong, Y. Zhang, J. Geng, D. Pang // *PLoS One.* - 2013. - Oct. - 11;8(10):e76408.

293. Shen, J. Genetic variation in telomere maintenance genes, telomere length and breast cancer risk / Shen J., Terry M.B., Liao Y., Gurvich I., Wang Q., Senie R.T., Santella R.M. // *PLoS One*. - 2012. - 7(9):44308.
294. Shoker, B.S. Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast / B.S. Shoker, C. Jarvis, R.B. Clarke, E. Anderson, J. Hewlett, M.P. Davies // *Am J Pathol*. - 1999. - 155(6):1811–1815
295. Shou, J. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer / J. Shou, S. Massarweh, C.K. Osborne // *J Natl Cancer Inst*. - 2004. - 96: 926–935.
296. Sidransky, D. Identification of p53 gene mutations in bladder cancers and urine samples / D. Sidransky, A. Von Eschenbach, Y.C. Tsai, P. Jones, I. Summerhayes, F. Marshall, M. Paul, P. Green, S.R. Hamilton, P. Frost // *Science*. - 1991. - May. - 3;252(5006):706-9.
297. Siggelkow, W. Expression of aurora kinase A is associated with metastasis-free survival in node-negative breast cancer patients / W. Siggelkow, D. Boehm, S. Gebhard // *BMC Cancer*. - 2012. - 12:562.
298. Silva, JM. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics / J.M. Silva, G. Dominguez, J. Silva, J.M. Garcia, A. Sanchez, O. Rodriguez, M. Provencio, P. España, F. Bonilla // *Clin Cancer Res*. - 2001. - Sep. - 7(9):2821-5.
299. Singletary, S.E. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer / S.E. Singletary, C. Allred, P. Ashley // *Journal of Clinical Oncology*. - 2002. - 20:3628-36.
300. Siu, A.L. Screening for Breast Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement/Siu AL// *Ann Intern Med*. – 2016. – Feb. – 16. - 164(4):279-96.
301. Skol, A.D. The genetics of breast cancer risk in the post-genome era: thoughts on study design to move past RCA and towards clinical relevance / A.D. Skol, M.M. Sasaki, K. Onel // *Breast Cancer Res*.- 2016. - Oct. - 3;18(1):99.

302. Slamon, D. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer / D. Slamon, W. Eiermann, N. Robert // *N Engl J Med.* - 2011. - 365: 1273– 1283.
303. Sofia, G. Estrogen Receptor Status in Breast Cancer Is Associated with Remarkably Distinct Gene Expression Patterns / Sofia G., Markus R., Yidong C., Sujatha P., Lao H. S. // *Cancer Res.* -2001. – 61: 5979-5984.
304. Sommer, K.W. Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras/Sommer KW1, Schamberger CJ, Schmidt GE, Sasgary S, Cerni C. // *Oncogene.* – 2003.- Jul.-3;22(27):4266-80.
305. Song, X.X. Integration of gene expression data and genetic variations involved in breast cancer / X.X. Song, X.D. Song, M. Wang, Y.L. Han, B. Liu, W. Sun, H.C. Jiang // *J BUON.* - 2016. - Jan-Feb. -21(1):61-9.
306. Sonnenblick, A. New strategies in breast cancer: the significance of molecular subtypes in systemic adjuvant treatment for small T1a,bN0M0 tumors / A. Sonnenblick , D. Fumagalli , H.A. Azim Jr, C. Sotiriou , M. Piccart // *Clin Cancer Res.* - 2014. - Dec. - 15;20(24):6242-6.
307. Sorlie, T. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications / T. Sørlie, C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P.E. Lønning, A.L. Borresen-Dale // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2001. - Sep. - 11; 98(19):10869-74.
308. Sorlie, T. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets / T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J.S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C.M. Perou, P.E. Lønning, P.O. Brown, A.L. Borresen-Dale, D. Botstein // *Proc Natl Acad Sci USA* - 2003. - Jul. - 8; 100(14):8418-23.
309. Sotiriou, C. Gene-expression signatures in breast cancer / C. Sotiriou, L. Pusztai // *N Engl J Med.* - 2009. - Feb. - 19;360(8):790-800.
310. Southern, E. M. Molecular interactions on microarrays / E. M. Southern // *Oncogen.* - 1999. - № 21. -C. 5-9.

311. Span, P.N. Concerns about mammaglobin assays / P.N. Span, N.I. Grebenchtchikov, A. Geurts-Moespot, C. G. J. Sweep // *Clinical Chemistry*. - 2005. - v.51. - №2. - p.474-75.
312. Sparano, J.A. Development of the 21-gene assay and its application in clinical practice and clinical trials / J.A. Sparano // *J Clin Oncol*. - 2008. - № 26. -C. 721-728.
313. Stamenkovic, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis/ Stamenkovic I.//*Semin Cancer Biol*.- 2000.- Dec.-10(6):415-33.
314. Stern, H.M. PTEN Loss Is Associated with Worse Outcome in HER2-Amplified Breast Cancer Patients but Is Not Associated with Trastuzumab Resistance / H.M. Stern , H. Gardner , T. Burzykowski, W. Elatre, C. O'Brien, M.R. Lackner, G.A. Pestano, A. Santiago, I. Villalobos, W. Eiermann, T. Pienkowski, M. Martin, N. Robert, J. Crown, P. Nuciforo , V. Bee , J. Mackey, D.J. Slamon, M.F. Press // *Clin Cancer Res* - 2015. - May. 1;21(9):2065-74.
315. Stine, Z.E. MYC, Metabolism, and Cancer / Z.E. Stine, Z.E. Walton, B.J. Altman, A.L. Hsieh, C.V. Dang // *Cancer Discov*. - 2015. - Oct. -5(10):1024-39.
316. Stuart-Harris, R. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in, 8 5 patients / R. Stuart-Harris , C. Caldas , S.E. Pinder , P. Pharoah // *Breast*. - 2008. - Aug; 7(4).
317. Suo, C. Integration of somatic mutation, expression and functional data reveals potential driver genes predictive of breast cancer survival / C. Suo, O. Hrydziusko, D. Lee, S. Pramana, D. Saputra, H. Joshi, S. Calza, Y. Pawitan // *Bioinformatics*. - 2015. Aug. - 15;31(16):2607-13.
318. Talmage, J.E. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective / J.E. Talmage, I. J. Fidler // *Cancer Res* - 2010. - Jul 15.
319. Tanaka, T. Centrosomal Kinase AIK1 Is Overexpressed in Invasive Ductal Carcinoma of the Breast / T. Tanaka, M. Kimura, K. Matsunaga, D. Fukada, H. Mori, Y. Okano // *Cancer Res* - 1999. - May 1. - 59; 2041

320. Taneja, P. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance / P. Taneja, D. Maglic, F. Kai, S. Zhu, R.D. Kendig, E.A. Fry, K. Inoue // *Clin Med Insights Oncol.* – 2010. – Apr. – 20(4):15-34.
321. Tang, G. S. B-14, B-20 Comparison of the Prognostic and Predictive Utilities of the 21-Gene Recurrence Score Assay and Adjuvant! for Women with Node-Negative, ER-Positive Breast Cancer: Results from NSABP B-14 and NSABP B-20/ G.S. Tang // *Breast Cancer Res Treat.* - 2001. - № 127. - C. 133-42.
322. Tang, W. Association between the STK15 F31I Polymorphism and Cancer Susceptibility: A MetaAnalysis Involving 43,626 Subjects / W. Tang, H. Qiu, H. Ding, B. Sun, L. Wang, J. Yin, H. Gu // *PLoS ONE* - 2013. - 8(12): e82790.
323. Tavassoéli, F.A. WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs Tumours (IARC WHO Classification of Tumours) / F.A. Tavassoéli, P. Devilee // 2003.
324. Tenori, L. Exploration of serum metabolomic profiles and outcomes in women with metastatic breast cancer: a pilot study / L. Tenori, C. Oakman, W.M. Claudino, P. Bernini, S. Cappadona, S. Nepi, L. Biganzoli, M.C. Arbushites, C. Luchinat, I. Bertini, A. Di Leo // *Mol Oncol.* - 2012. - Aug. - 6(4):437-444.
325. Theissig, F. Histological grading of breast cancer: interobserver, reproducibility and prognostic significance / F. Theissig, K.D. Kunze, G. Haroske, W. Meyer // *Pathology Research And Practice.* - 1990. - 186: 732-6.37.
326. Thorner, A.R. In vitro and in vivo analysis of B-Myb in basal-like breast cancer / Thorner A.R., Hoadley K.A., Parker J.S., Winkel S., Millikan R.C., Perou C.M. // *Oncogene.* - 2009. - Feb. - 5;28(5):742-51.
327. Toru Hirota, Aurora-A and an Interacting Activator, the LIM Protein Ajuba, Are Required for Mitotic Commitment in Human Cells/ Toru Hirota // *Cell.* - 2003. - 114: 585–598.
328. Tripathi, A. Gene expression abnormalities in histologically normal breast epithelium of breast cancer patients / A. Tripathi , C. King , A. de la Morenas , V.K. Perry , B. Burke , G.A. Antoine , E.F. Hirsch , M. Kavanah , J. Mendez , M. Stone ,

N.P. Gerry , M.E. Lenburg , C.L. Rosenberg // *Int J Cancer*. - 2008. - Apr. - 1;122(7):1557-66.

329. Vader, G. The Aurora kinase family in cell division and cancer / G. Vader, S.M. Lens // *Biochim Biophys Acta*. - 2008. - 1786:60-72.

330. van 't Veer, L.J. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer / L.J. van 't Veer, H. Dai, M.J. van de Vijver // *Nature*. - 2002. - 415:530-6.

331. van de Vijver, M.J. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer / M.J. van de Vijver, Y.D. He, L.J. van 't Veer // *New England Journal of Medicine (NEJM)*. - 2002. - 347:1999-200.

332. Van Dongen, J. A. Long-term results of a randomized trial comparing breast-conserving therapy with mastectomy: European Organization for Research and Treatment of Cancer 10801 trial/ Van Dongen J. A., Voogd A. C., Fentiman I.S. // *Journal of the National Cancer Institute*. - 2000. - 92(14):1143-1150.

333. Vaz-Luis, I. Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: does estrogen receptor status define two distinct subtypes? / I. Vaz-Luis, E.P. Winer, N.U. Lin // *Annals of Oncology*. - 2013. - 24: 283–291. 31.

334. Viale, G. Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98 / G. Viale, M.M. Regan, E. Maiorano // *J Clin Oncol*. - 2007. - 25: 3846– 3852.

335. Vogelstein, B. Cancer genome landscapes / B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V.E. Velculescu, S. Zhou, L.A.Jr. Diaz // *Science*. - 2013. - 339: 1546– 1558.

336. Voogd, A.C. Long term prognosis of patients with local recurrence after conservative surgery and radiotherapy for early breast cancer / A.C. Voogd, F.J. van Oost, E.J. Rutgers, // *Eur J cancer*. - 2005. - 41: 2637-2644.

337. Wagner, P. Microtubule Associated Protein (MAP)-Tau: A novel mediator of paclitaxel sensitivity in vitro and in vivo/ Wagner P., Wang B., Clark E. // *Cell Cycle*. - 2005. - 4: 647-667.

338. Walsh, M.F. Genomic Biomarkers for Breast Cancer Risk / M.F. Walsh, K.L. Nathanson, F.J. Couch, K. Offit // *Adv Exp Med Biol.* - 2016. - 882:1-32.
339. Wang, Y. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer / Y. Wang, J.G. Klijn, Y. Zhang, A.M. Sieuwerts, M.P. Look, F. Yang, D. Talantov, M. Timmermans, M.E. Meijer-van Gelder, J. Yu, T. Jatkoe, E.M. Berns, D. Atkins, J.A. Foekens // *Lancet.* - 2005. - Feb. - 19. - 25:365(9460):671-9.
340. Wang, Z. The prognostic biomarkers HOXB13, IL17BR, and CHDH are regulated by estrogen in breast cancer/ Wang Z, Dahiya S, Provencher H, Muir B, Carney E, Coser K, Shioda T, Ma XJ, Sgroi DC.//*Clin Cancer Res.* - 2007. - Nov. - 1;13(21):6327-34.
341. Watson, M.A. Mammaglobin expression in primary, metastatic, and occult breast cancer / M.A. Watson, S. Dintzis, C.M. Darrow, L.E. Voss, J. DiPersio, R. Jensen, T.P. Fleming // *Cancer Res* - 1999. - 59: 3028-3031.
342. Watson, MA. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer / M.A. Watson, T.P. Fleming // *Cancer Res.* - 1996. - 56:860-865.
343. Weier, H.U. Meta-analysis of Aurora Kinase A (AURKA) Expression Data Reveals a Significant Correlation Between Increased AURKA Expression and Distant Metastases in Human ER-positive Breast Cancers / H.U. Weier, J.H. Mao//*J Data Mining Genomics Proteomics.* - 2013. - 4:127.
344. Weigelt, B. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis / B. Weigelt, A. Mackay, R. A'Hern // *Lancet Oncol.* - 2010. - 11:339-349.
345. Weigelt, B. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? / B. Weigelt, J.S. Reis-Filho // *Nat Rev Clin Oncol* - 2009. - 6:718-730.
346. Weissenbacher, T.M. Multicentric and multifocal versus unifocal breast cancer: is the tumornode-metastasis classification justified? / T.M. Weissenbacher, M. Zschage, W. Janni // *Breast Cancer Res Treat.* - 2010. - 122: 27-34.

347. Winer, E.P. American Society of Clinical Oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: status report 2004/ Winer EP, Hudis C, Burstein HJ, Wolff AC, Pritchard KI, Ingle JN, Chlebowski RT, Gelber R, Edge SB, Gralow J, Cobleigh MA, Mamounas EP, Goldstein LJ, Whelan TJ, Powles TJ, Bryant J, Perkins C, Perotti J, Braun S, Langer AS, Browman GP, Somerfield MR.//J Clin Oncol.- 2005.- Jan.- 20;23(3):619-29.

348. Witkiewicz, A.K. RB-Pathway Disruption Is Associated with Improved Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer / A.K. Witkiewicz, A. Ertel, J. McFalls, M.E. Valsecchi, G. Schwartz, E. S. Knudsen // Clin Cancer Res - 2012. - Sep 15. - 18(18): 5110-22

349. Wojtyla, A. Human telomerase activity regulation/ A. Wojtyla, M. Gladych, B. Rubis // Mol Biol Rep. - 2011. - Jun. - 38(5):3339-49.

350. Wong, C.H. CTSL2 is a pro-apoptotic target of E2F1 and a modulator of histone deacetylase inhibitor and DNA damage-induced apoptosis / C.H. Wong, Z. Wu , Q. Yu // Oncogene. - 2014. - Mar. - 6;33(10):1249-57.

351. Wu, T.T. Augmented release of matrix metalloproteinase-9 by PKC activation in organotypic cultures of human breast cancer and adjacent normal breast tissue and fibroadenoma / T.T. Wu, J.H. Tsai , J.H. Tsai , S.J. Kuo , S.Y. Yu, C.Y. Huang, H.Y. Hsieh, Y.S. Hsieh, J.Y. Liu, J. Chin // Physiol. - 2004. - Jun. - 30;47(2):73-8.

352. Xu, J. MYC and Breast Cancer / J. Xu, Y. Chen, and O. I. Olopade // Genes Cancer. - 2010. - Jun. 1(6): 629–640.

353. Xue, K.X. Molecular genetic and epigenetic mechanisms of hepatocarcinogenesis/ Xue, K.X. // Ai Zheng .- 2005.- 24:757-768.

354. Yager, J.D. Estrogen carcinogenesis in breast cancer/ Yager JD, Davidson NE// N Engl J Med. – 2006. - Jan. - 19;354(3):270-82.

355. Yamamoto, S. A comprehensive analysis of Aurora A; transcript levels are the most reliable in association with proliferation and prognosis in breast cancer / S.

Yamamoto , M. Yamamoto-Ibusuki , Y. Yamamoto , S. Fujiwara , H. Iwase // BMC Cancer. - 2013. - Apr. -30;13:217.

356. Yang, J. PTEN mutation spectrum in breast cancers and breast hyperplasia / J. Yang , Y. Ren , L. Wang , B. Li , Y. Chen , W. Zhao , W. Xu , T. Li , F. Dai // J Cancer Res Clin Oncol. - 2010. - Sep. - 136(9):1303-11.

357. Yang, X.Q. High Ki-67 expression is a poor prognostic indicator of 5-year recurrence free survival in patients with invasive breast cancer / X.Q. Yang , F.B. Wang, C. Chen, C.W. Peng, J.F. Zhang, Y. Li // Asian Pac J Cancer Prev. - 2011. - 12(11):3101-5.

358. Yarden, Y. Nat Untangling the ErbB signalling network / Y. Yarden, M.X. Sliwkowsk // Rev Mol Cell Biol. - 2001. - Feb;2(2):127-37.

359. Yerushalmi, R. Is breast conserving therapy a safe option for patients with tumor multicentricity and multifocality / R. Yerushalmi, S. Tyldesley, R. Woods // Ann Oncol. - 2012. - 23: 876-881.

360. Yu, B. Expression of the apoptosis-related genes BCL-2 and BAD in human breast carcinoma and their associated relationship with chemosensitivity/ Yu B, Sun X, Shen HY, Gao F, Fan YM, Sun ZJ.// J Exp Clin Cancer Res. - 2010. - Aug. - 7;29:107.

361. Yu, K-D. Different annual recurrence pattern between lumpectomy and mastectomy: implication for breast cancer surveillance after breast-conserving surgery/ Yu K-D., Li S., Shao Z. M. //The oncologist. – 2011. -16 P.1101–1110.

362. Yu, Y.H. Diagnostic value of vacuum-assisted breast biopsy for breast carcinoma: a meta-analysis and systematic review/ Yu Y.H., Liang C., Yuan X.Z. // Breast Cancer Res Treat. – 2010. – Apr. -120(2):469-79.

363. Zach, O. Mammaglobin as a marker for the detection of tumor cells in the peripheral blood of breast cancer patients / O. Zach, H. Kasparu, H. Wagner, O. Krieger, D. Lutz // Ann N Y Acad Sci. - 2000. - 923:343-5.

364. Zehentner, B.K. Expression of Mammaglobin, B305D, GABA π and B726P and elevation of Mammaglobin protein in the peripheral blood of women with untreated breast cancers / B.K. Zehentner, D.H. Persing , A. Deme , P. Toure , S.E. Hawes , L.

Brooks , Q. Feng , D.C. Hayes , C.W. Critchlow , R.L. Houghton , N.B. Kiviat // Clin Chem. - 2004. - November. - 50(11): 2069–2076.

365. Zhang, A.H. Metabolomics in noninvasive breast cancer / A.H. Zhang, H. Sun, S. Qiu, X.J. Wang // Clin Chim Acta. - 2013. - Sep 23. - 424:3-7.

366. Zhang, H.Y. PTEN mutation, methylation and expression in breast cancer patients / H.Y. Zhang, F. Liang, Z.L. Jia, S.T. Song, Z.F. Jiang // Oncol Lett. - 2013. - Jul;6(1):161-168.

367. Zhang, Y. Elevated Aurora B expression contributes to chemoresistance and poor prognosis in breast cancer / Y. Zhang, C. Jiang, H. Li, F. Lv, X. Li, X. Qian, L. Fu, B. Xu, Xiaojing Guo // Int J Clin Exp Pathol. - 2015. - 8(1): 751–757

368. Zheng, F.M. A novel small molecule aurora kinase inhibitor attenuates breast tumor-initiating cells and overcomes drug resistance / F.M. Zheng, Z.J. Long, Z.J. Hou // Mol Cancer Ther. - 2014. - 13:1991-2003.

369. Zubor, P. Gene expression profiling of histologically normal breast tissue in females with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer / P. Zubor , J. Hatok , P. Moricova , I. Kapustova , K. Kajo , A. Mendelova , M.K. Sivonova , J. Danko // Mol Med Rep. - 2015. - Feb. - 11(2):1421-7.

370. Zugazagoitia, J. The new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification from a clinical perspective: current concepts and future prospects / J. Zugazagoitia, A.B. Enguita, J.A. Nuñez, L. Iglesias, S. Ponce // J Thorac Dis. - 2014. - Oct. - 6(Suppl 5):S526-36

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Таблица 1 - Корреляционная матрица уровня экспрессии генов в ткани опухоли из архива криохранилища n=147

	MGB 1	CTSL 2	BCL 2	MY C	BIRC 5	CCND 1	NDRG 1	CD6 8	KI6 7	TER T	HER 2	PTE N	BAG 1	PG R	CCNB 1	ESR 1	GRB 7	MMP1 1	STK1 5	MYBL 2	P16INK4 A
MGB1	1,00	-0,08	0,19	-0,14	-0,09	0,13	0,05	0,06	-0,17	-0,08	-0,01	-0,06	0,07	0,14	-0,08	0,32	-0,01	0,57	-0,16	-0,15	-0,11
CTSL2	-0,08	1,00	-0,17	0,15	0,48	-0,09	0,28	-0,02	0,49	0,37	-0,01	-0,06	-0,06	-0,14	0,30	-0,16	0,02	-0,02	0,37	0,57	0,25
BCL2	0,19	-0,17	1,00	0,15	-0,22	0,44	0,08	0,06	-0,39	-0,06	-0,15	0,10	0,56	0,33	-0,17	0,38	-0,17	0,23	-0,21	-0,28	-0,25
MYC	-0,14	0,15	0,15	1,00	0,05	0,07	-0,00	0,09	0,01	0,38	-0,17	0,06	0,20	0,07	0,08	-0,09	-0,18	-0,20	0,23	0,17	-0,06
BIRC5	-0,09	0,48	-0,22	0,05	1,00	-0,02	0,31	0,06	0,53	0,25	0,10	-0,19	-0,08	-0,05	0,53	0,01	0,10	-0,02	0,65	0,70	0,25
CCND1	0,13	-0,09	0,44	0,07	-0,02	1,00	-0,03	-0,06	-0,05	-0,03	-0,02	0,15	0,24	0,22	0,18	0,33	-0,02	0,11	0,05	0,02	-0,21
NDRG1	0,05	0,28	0,08	-0,00	0,31	-0,03	1,00	-0,05	0,06	0,15	-0,09	-0,22	0,15	-0,01	-0,09	0,02	-0,12	0,18	0,05	-0,06	0,42
CD68	0,06	-0,02	0,06	0,09	0,06	-0,06	-0,05	1,00	-0,11	-0,09	-0,01	0,14	0,02	0,01	-0,08	-0,02	-0,03	0,10	0,01	-0,00	-0,23
KI67	-0,17	0,49	-0,39	0,01	0,53	-0,05	0,06	-0,11	1,00	0,33	0,16	0,04	-0,21	-0,20	0,69	-0,19	0,24	-0,16	0,54	0,60	0,16
TERT	-0,08	0,37	-0,06	0,38	0,25	-0,03	0,15	-0,09	0,33	1,00	0,03	-0,09	-0,05	-0,11	0,28	-0,12	0,04	-0,02	0,27	0,28	0,42
HER2	-0,01	-0,01	-0,15	-0,17	0,10	-0,02	-0,09	-0,01	0,16	0,03	1,00	0,13	-0,12	-0,12	0,16	-0,15	0,88	0,06	0,08	0,10	-0,11
PTEN	-0,06	-0,06	0,10	0,06	-0,19	0,15	-0,22	0,14	0,04	-0,09	0,13	1,00	0,06	-0,07	0,28	-0,04	0,15	-0,08	-0,06	-0,10	-0,08
BAG1	0,07	-0,06	0,56	0,20	-0,08	0,24	0,15	0,02	-0,21	-0,05	-0,12	0,06	1,00	0,23	-0,08	0,25	-0,14	0,11	0,15	-0,11	-0,25
PGR	0,14	-0,14	0,33	0,07	-0,05	0,22	-0,01	0,01	-0,20	-0,11	-0,12	-0,07	0,23	1,00	-0,00	0,41	-0,13	0,09	-0,09	-0,10	-0,12
CCNB1	-0,08	0,30	-0,17	0,08	0,53	0,18	-0,09	-0,08	0,69	0,28	0,16	0,28	-0,08	-0,00	1,00	0,04	0,24	-0,06	0,59	0,64	0,07
ESR1	0,32	-0,16	0,38	-0,09	0,01	0,33	0,02	-0,02	-	-0,12	-0,15	-0,04	0,25	0,41	0,04	1,00	-0,18	0,42	-0,03	-0,08	-0,10

									0,19												
GRB7	-0,01	0,02	-0,17	-0,18	0,10	-0,02	-0,12	-0,03	0,24	0,04	0,88	0,15	-0,14	-0,13	0,24	-0,18	1,00	-0,05	0,13	0,15	-0,11
MMP11	0,57	-0,02	0,23	-0,20	-0,02	0,11	0,18	0,10	-0,16	-0,02	0,06	-0,08	0,11	0,09	-0,06	0,42	-0,05	1,00	-0,12	-0,11	-0,08
STK15	-0,16	0,37	-0,21	0,23	0,65	0,05	0,05	0,01	0,54	0,27	0,08	-0,06	0,15	-0,09	0,59	-0,03	0,13	-0,12	1,00	0,73	-0,01
MYBL2	-0,15	0,57	-0,28	0,17	0,70	0,02	-0,06	-0,00	0,60	0,28	0,10	-0,10	-0,11	-0,10	0,64	-0,08	0,15	-0,11	0,73	1,00	0,02
P16INK4 A	-0,11	0,25	-0,25	-0,06	0,25	-0,21	0,42	-0,23	0,16	0,42	-0,11	-0,08	-0,25	-0,12	0,07	-0,10	-0,11	-0,08	-0,01	0,02	1,00

Таблица 2 - Корреляционная матрица уровня экспрессии генов в послеоперационной ткани опухоли РМЖ «без заморозки) n=68

	KI 67	STK15	BIRC5	CCNB1	MMP11	CTSL2	HER-2/new	GRB7	BCL2	BAG	BAX	NDRG1	ESR	PRG	PTEN	MGB1	TERT
KI 67	1,00	0,61	0,74	0,49	0,15	0,62	0,09	0,13	-0,37	-0,22	0,44	0,02	-0,11	-0,10	-0,19	-0,17	0,43
STK15	0,61	1,00	0,71	0,57	0,13	0,50	0,10	0,10	-0,30	-0,22	0,45	0,11	-0,07	-0,04	-0,38	-0,17	0,18
BIRC5	0,74	0,71	1,00	0,64	-0,00	0,85	0,09	0,18	-0,31	-0,10	0,45	0,09	-0,12	-0,08	-0,23	-0,15	-0,01
CCNB1	0,49	0,57	0,64	1,00	-0,02	0,24	0,31	0,35	-0,20	-0,14	0,24	0,16	0,12	0,21	-0,25	-0,17	0,10
MMP11	0,15	0,13	-0,00	-0,02	1,00	0,00	-0,10	-0,13	-0,19	-0,19	0,18	-0,08	0,01	-0,06	-0,08	-0,01	0,01
CTSL2	0,62	0,50	0,85	0,24	0,00	1,00	0,01	0,00	-0,17	-0,04	0,44	0,12	-0,14	-0,13	-0,14	-0,05	-0,01
HER-2/new	0,09	0,10	0,09	0,31	-0,10	0,01	1,00	0,73	-0,19	-0,16	0,23	0,16	-0,21	-0,17	0,08	-0,04	0,53
GRB7	0,13	0,10	0,18	0,35	-0,13	0,00	0,73	1,00	-0,23	-0,13	0,20	-0,03	-0,23	-0,18	0,27	-0,03	0,34
BCL2	-0,37	-0,30	-0,31	-0,20	-0,19	-0,17	-0,19	-0,23	1,00	0,44	-0,09	0,29	0,61	0,32	0,20	-0,08	-0,16
BAG	-0,22	-0,22	-0,10	-0,14	-0,19	-0,04	-0,16	-0,13	0,44	1,00	-0,35	-0,07	0,33	0,04	0,32	0,03	-0,20
BAX	0,44	0,45	0,45	0,24	0,18	0,44	0,23	0,20	-0,09	-0,35	1,00	0,08	-0,14	-0,04	-0,08	-0,16	0,46
NDRG1	0,02	0,11	0,09	0,16	-0,08	0,12	0,16	-0,03	0,29	-0,07	0,08	1,00	0,19	0,11	-0,07	-0,07	0,14
ESR	-0,11	-0,07	-0,12	0,12	0,01	-0,14	-0,21	-0,23	0,61	0,33	-0,14	0,19	1,00	0,59	-0,06	-0,08	-0,20
PRG	-0,10	-0,04	-0,08	0,21	-0,06	-0,13	-0,17	-0,18	0,32	0,04	-0,04	0,11	0,59	1,00	-0,04	-0,00	-0,20
PTEN	-0,19	-0,38	-0,23	-0,25	-0,08	-0,14	0,08	0,27	0,20	0,32	-0,08	-0,07	-0,06	-0,04	1,00	0,07	0,21

MGB1	-0,17	-0,17	-0,15	-0,17	-0,01	-0,05	-0,04	-0,03	-0,08	0,03	-0,16	-0,07	-0,08	-0,00	0,07	1,00	-0,12
TERT	0,43	0,18	-0,01	0,10	0,01	-0,01	0,53	0,34	-0,16	-0,20	0,46	0,14	-0,20	-0,20	0,21	-0,12	1,00

Таблица 3 — Средние значения и стандартные отклонения значений уровней экспрессии генов в выявленных фенотипах

Ген	А		В		С		D		Е	
	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD	Среднее	SD
<i>KI67</i>	9,40	0,71	7,65	1,33	7,78	0,96	5,95	2,38	8,14	0,95
<i>STK15</i>	5,78	1,15	5,14	1,91	4,90	1,13	3,41	2,26	5,36	1,66
<i>CCNB1</i>	5,18	0,77	4,49	1,07	4,39	0,86	3,74	1,41	5,03	1,16
<i>CCND</i>	2,89	1,46	3,78	1,20	4,78	1,52	3,83	1,30	3,08	1,35
<i>MYC</i>	3,97	1,08	3,76	1,51	3,17	1,24	4,33	1,54	4,31	1,55
<i>MYBL2</i>	6,34	0,67	4,57	1,45	4,31	1,38	3,39	1,69	6,10	1,43
<i>P16ink4A</i>	6,93	2,10	5,21	1,30	4,80	0,72	5,15	1,28	6,18	2,03
<i>PTEN</i>	4,39	0,79	5,25	0,89	5,05	0,75	5,57	1,00	4,36	1,33
<i>BIRC5</i>	6,34	1,33	4,57	2,11	4,91	1,69	2,36	2,26	4,23	2,40
<i>BCL2</i>	2,36	1,40	4,66	1,62	4,84	1,84	4,97	2,13	3,70	1,91
<i>BAG</i>	1,97	0,68	3,07	1,02	2,89	1,02	3,30	1,16	2,73	1,13
<i>TERT</i>	7,30	1,70	7,41	2,14	4,25	2,94	0,19	0,86	1,41	2,45
<i>ESR1</i>	3,65	2,15	9,11	2,44	9,84	1,54	9,88	2,64	6,03	2,75
<i>PGR</i>	2,31	1,47	7,49	2,05	7,32	1,61	8,36	2,31	4,21	2,39
<i>HER2/neu</i>	4,01	1,52	6,06	1,83	4,97	1,21	5,59	1,64	8,20	2,23
<i>GRB7</i>	8,22	1,35	8,92	1,75	8,15	0,91	8,62	1,65	11,30	2,03
<i>MGB</i>	7,70	3,48	18,23	2,48	12,08	2,64	16,84	3,94	16,19	3,10
<i>MMP</i>	9,34	2,23	11,32	2,41	11,16	2,24	10,10	3,86	12,75	2,80
<i>CTSL</i>	7,23	1,27	5,34	1,48	4,79	1,06	5,31	2,25	6,64	1,71

Таблица 4 — Статистическая значимость межгрупповых отличий уровней экспрессии генов с использованием критерия Ньюмана-Кеулса

<i>KI67</i>						<i>STK15</i>					
Фенотип	А	В	С	Д	Е	Фенотип	А	В	С	Д	Е
А	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	А	-	0,15	0,05	>0,001	0,22
В	>0,001	-	0,66	>0,001	0,24	В	0,15	-	0,49	>0,001	0,53
С	>0,001	0,66	-	>0,001	0,24	С	0,05	0,49	-	>0,001	0,38
Д	>0,001	>0,001	>0,001	-	>0,001	Д	>0,001	>0,001	>0,001	-	>0,001
Е	>0,001	0,24	0,24	>0,001	-	Е	0,22	0,53	0,38	>0,001	-
<i>CCNB1</i>						<i>CCND</i>					
Фенотип	А	В	С	Д	Е	Фенотип	А	В	С	Д	Е
А	-	>0,001	>0,001	>0,001	0,51	А	-	>0,001	>0,001	>0,001	0,44
В	>0,001	-	0,65	>0,001	0,01	В	>0,001	-	>0,001	0,84	0,01
С	>0,001	0,65	-	>0,001	0,01	С	>0,001	>0,001	-	>0,001	>0,001
Д	>0,001	>0,001	>0,001	-	>0,001	Д	>0,001	0,84	>0,001	-	0,01
Е	0,51	0,01	0,01	>0,001	-	Е	0,44	0,01	>0,001	0,01	-
<i>MIC</i>						<i>MYBL2</i>					
Фенотип	А	В	С	Д	Е	Фенотип	А	В	С	Д	Е
А	-	0,44	0,01	0,39	0,22	А	-	>0,001	>0,001	>0,001	0,39
В	0,44	-	0,03	0,16	0,11	В	>0,001	-	0,35	>0,001	>0,001
С	0,01	0,03	-	>0,001	>0,001	С	>0,001	0,35	-	>0,001	>0,001
Д	0,39	0,16	>0,001	-	0,95	Д	>0,001	>0,001	>0,001	-	>0,001
Е	0,22	0,11	>0,001	0,95	-	Е	0,39	>0,001	>0,001	>0,001	-
<i>PTEN</i>						<i>P16ink4A</i>					
Фенотип	А	В	С	Д	Е	Фенотип	А	В	С	Д	Е
А	-	>0,001	>0,001	>0,001	0,87	А	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001
В	>0,001	-	0,27	0,08	>0,001	В	>0,001	-	0,26	0,81	>0,001
С	>0,001	0,27	-	0,01	>0,001	С	>0,001	0,26	-	0,18	>0,001
Д	>0,001	0,08	0,01	-	>0,001	Д	>0,001	0,81	0,18	-	>0,001
Е	0,87	>0,001	>0,001	>0,001	-	Е	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	-

Продолжение таблицы 2

<i>TERT</i>						<i>BIRC5</i>					
Фенотип	A	B	C	D	E	Фенотип	A	B	C	D	E
A	-	0,78	>0,001	>0,001	>0,001	A	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001
B	0,78	-	>0,001	>0,001	>0,001	B	>0,001	-	0,38	>0,001	0,38
C	>0,001	>0,001	-	>0,001	>0,001	C	>0,001	0,38	-	>0,001	0,18
D	>0,001	>0,001	>0,001	-	>0,001	D	>0,001	>0,001	>0,001	-	>0,001
E	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	-	E	>0,001	0,38	0,18	>0,001	-
<i>BCL2</i>						<i>BAG1</i>					
Фенотип	A	B	C	D	E	Фенотип	A	B	C	D	E
A	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	A	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001
B	>0,001	-	0,61	0,65	0,01	B	>0,001	-	0,39	0,23	0,21
C	>0,001	0,61	-	0,72	>0,001	C	>0,001	0,39	-	0,10	0,41
D	>0,001	0,65	0,72	-	>0,001	D	>0,001	0,23	0,10	-	0,02
E	>0,001	0,01	>0,001	>0,001	-	E	>0,001	0,21	0,41	0,02	-
<i>ESR1</i>						<i>PGR</i>					
Фенотип	A	B	C	D	E	Фенотип	A	B	C	D	E
A	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	A	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001
B	>0,001	-	0,10	0,19	>0,001	B	>0,001	-	0,67	0,02	>0,001
C	>0,001	0,10	-	0,91	>0,001	C	>0,001	0,67	-	0,02	>0,001
D	>0,001	0,19	0,91	-	>0,001	D	>0,001	0,02	0,02	-	>0,001
E	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	-	E	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	-
<i>HER2/neu</i>						<i>GRB7</i>					
Фенотип	A	B	C	D	E	Фенотип	A	B	C	D	E
A	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	A	-	0,05	0,82	0,17	>0,001
B	>0,001	-	>0,001	0,14	>0,001	B	0,05	-	0,05	0,32	>0,001
C	>0,001	>0,001	-	0,05	>0,001	C	0,82	0,05	-	0,25	>0,001
D	>0,001	0,14	0,05	-	>0,001	D	0,17	0,32	0,25	-	>0,001
E	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	-	E	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	-
<i>MGB1</i>						<i>MMP11</i>					
Фенотип	A	B	C	D	E	Фенотип	A	B	C	D	E
A	-	>0,001	>0,001	>0,001	>0,001	A	-	>0,001	>0,001	0,17	>0,001

B	>0,001	-	>0,001	0,02	>0,001	B	>0,001	-	0,77	0,07	0,01
C	>0,001	>0,001	-	>0,001	>0,001	C	>0,001	0,77	-	0,05	0,01
D	>0,001	0,02	>0,001	-	0,28	D	0,17	0,07	0,05	-	>0,001
E	>0,001	>0,001	>0,001	0,28	-	E	>0,001	0,01	0,01	>0,001	-
CTSL2											
Фенотип	A	B	C	D	E						
A	-	>0,001	>0,001	>0,001	0,07						
B	>0,001	-	0,20	0,93	>0,001						
C	>0,001	0,20	-	0,11	>0,001						
D	>0,001	0,93	0,11	-	>0,001						
E	0,07	>0,001	>0,001	>0,001	-						