

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

На правах рукописи

**Тащян Агван Александрович**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ВЕРИФИКАЦИИ МЕТАСТАЗОВ В СИГНАЛЬНОМ  
ЛИМФОУЗЛЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАДИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ**

14.01.12 – онкология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**

Академик РАН,

доктор медицинских наук, профессор

В.А. Солодкий

Москва —2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ МЕТАСТАЗОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СИГНАЛЬНЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР).....	10
1.1. Методы диагностики метастазов в регионарные лимфатические узлы при раке молочной железы .....	11
1.1.1. Неинвазивные методы.....	11
1.1.2. Радикальная лимфаденэктомия как метод стадирования регионарного распространения РМЖ.....	14
1.1.3. Концепция сигнального лимфоузла.....	16
1.1.4. Лимфатическая система молочной железы .....	17
1.1.5. Показания и клинические аспекты биопсии СЛУ.....	18
1.1.6. Методологические аспекты биопсии СЛУ .....	24
1.1.7. Лабораторные методы диагностики метастазов в сигнальные лимфатические узлы .....	28
1.1.7.1. Морфологические методы исследования сигнальных лимфатических узлов.....	28
1.1.7.2. Молекулярные маркеры в диагностике метастазов в СЛУ .....	32
1.1.7.3. Интраоперационный экспресс анализ экспрессии генов для оценки метастатического поражения СЛУ .....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	42
2.1. Описание обследуемых групп.....	42
2.2. Инструментальные методы обследования.....	52
2.3. Патоморфологическое исследование .....	57
а. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (РВ-ПЦР) как основной метод исследования.....	59

і. Методика пробоподготовки и РВ-ПЦР в настоящем исследовании .....	61
в. Статистические методы анализа .....	63
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИАГНОСТИКИ МЕТАСТАЗОВ В СИГНАЛЬНЫЕ ЛИМФОУЗЛЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....</b>	<b>65</b>
3.1. Результаты визуализации СЛУ .....	65
3.1.1. Определение сигнального лимфоузла с использованием планарной сцинтиграфии и ОФЭКТ-КТ .....	65
3.1.2. Определение сигнального лимфоузла с использованием гамма-сканера .	75
3.2. Анализ уровня экспрессии маркеров опухоли в определении метастазов в сигнальном лимфатическом узле.....	77
3.2.1. Сравнительный анализ уровня экспрессии генов в зависимости от количества материала, взятого в исследование .....	77
3.2.2. Сравнительный анализ уровней экспрессии генов в ткани метастатического и интактного лимфоузла .....	78
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>89</b>
<b>ВЫВОДЫ: .....</b>	<b>99</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>100</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>101</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>102</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Наличие метастазов в регионарных лимфатических узлах при раке молочной железы является наиболее значимым фактором прогноза как общей, так и безрецидивной выживаемости (1), (2), оказывающим непосредственное влияние на выбор тактики послеоперационного лечения. Факторами, повышающими риск метастатического поражения регионарных лимфоузлов, являются большой размер опухоли, лимфоваскулярная инвазия, степень злокачественности, наличие опухолевых эмболов в лимфатических щелях и т. д. (3) (4). Однако все эти признаки позволяют лишь оценить вероятность метастатического распространения опухоли и не могут быть использованы в качестве диагностической альтернативы подмышечно-подключично-подлопаточной лимфаденэктомии с патоморфологическим исследованием (5). Использование современных скрининговых программ, высокая разрешающая способность лучевых методов исследования и формирование модели онкологической настороженности у врачей и пациентов привели к повышению частоты диагностики рака молочной железы на ранних (I-II) стадиях заболевания, тем не менее на современном этапе использование маммографии, МРТ, ПЭТ и радиоизотопных методов исследования для оценки зон регионарного метастазирования при РМЖ отличается высоким процентом ложноотрицательных результатов, а послеоперационное патоморфологическое исследование регионарных лимфоузлов остается золотым стандартом диагностики.

С другой стороны, лимфаденэктомия подмышечного, подключичного и подлопаточного пространств сопровождается повреждением большого количества лимфатических и кровеносных сосудов, а также риском повреждения сосудисто-нервных пучков данных анатомических областей. Помимо лимфореи в послеоперационном периоде, длительность которой может достигать нескольких недель, типичными осложнениями могут быть отек, парез или нарушение чувствительности верхней конечности. Все эти обстоятельства значительно

ухудшают качество жизни больного в послеоперационном периоде и увеличивают длительность госпитализации.

В качестве альтернативы лимфаденэктомии при отсутствии признаков регионарного метастазирования на дооперационном этапе может рассматриваться интраоперационная лимфодиссекция сторожевого (сигнального) лимфоузла (СЛУ). Большим количеством исследований было подтверждено, что распространение опухоли начинается с появления метастазов в одном или двух ближайших по ходу тока лимфы лимфатических узлах, а потом в процесс вовлекаются другие, в первую очередь, подмышечные лимфоузлы. Сторожевые лимфоузлы могут быть визуализированы с использованием различных красителей, радиоизотопных коллоидных растворов или комбинации этих методов, чувствительность которых варьирует в пределах от 82 до 99% (6). Использование красителей, в частности изосульфана синего 1% (Лимфазурин<sup>TM</sup>, US Surgical Corp, Norwalk, CT) или метиленового синего, характеризуется относительной простотой, но сравнительно невысокой чувствительностью 65,5% и высокой специфичностью (95,5%) (7). Сочетание этого метода с радиоизотопным анализом (коллоидный технеций-99m) повышает чувствительность и специфичность методики до 98% (8).

В этих и других исследованиях авторы продемонстрировали, что техника биопсии регионарного лимфоузла может стать для определенной категории пациентов альтернативой регионарной лимфаденэктомии, что, безусловно, повлияет на снижение частоты послеоперационных осложнений и сократит длительность госпитализации (9) (10). При этом необходимо учитывать наличие определенных факторов, существенно снижающих чувствительность метода и поэтому являющихся противопоказаниями для биопсии сторожевого лимфоузла. К ним можно отнести большой размер опухоли (T3), местно-распространенный процесс (T4), воспалительную форму РМЖ, рак *in situ* в случае органосохраняющего лечения, хирургические операции на молочной железе или подмышечной области в анамнезе (11). Одновременно, согласно современным

представлениям, мультицентрическая форма РМЖ, ожирение, рак грудной железы у мужчин, ранее проводимая биопсия не влияют на чувствительность метода.

Чувствительность биопсии сторожевого лимфоузла, согласно обзору и клиническим рекомендациям Американской ассоциации клинических онкологов (ASCO), составляет от 71 до 100%, вероятность получения ложноотрицательного результата варьирует в диапазоне от 0 до 29%, в среднем составляя 8,4% (11). Большой диапазон значений является следствием использования различной техники визуализации СЛУ, различных морфологических критериев диагностики метастаза и т. д. В частности, до настоящего времени не существует единого мнения относительно диагностического значения микрометастазов (МкМ) [0,2 – 2 мм] и единичных опухолевых клеток (ЕОК) [ $>0,2$  мм] в СЛУ (15, 16, 17). Казалось бы, обнаружение элементов опухоли в лимфоузле должно однозначно трактоваться в пользу выбора более агрессивной тактики. Однако, ввиду большой сложности и трудоемкости визуализации микроскопических очагов, исследований, посвященных проблеме клинического значения МкМ и ЕОК, явно недостаточно. С одной стороны, согласно рекомендациям ASCO и ESMO, неоднозначно трактуются МкМ и ЕОК. С другой стороны, при наличии единичных опухолевых клеток или микрометастазов в СЛУ, вероятность метастатического поражения других лимфатических коллекторов составляет 10 и 20-35% соответственно (12). Необходимо также учитывать, что исследование СЛУ выполняется интраоперационно и ограничено во времени, а для выявления столь малых очагов необходимо проведение тщательного морфологического или иммуногистохимического исследования, что не может быть реализовано в условиях интраоперационной диагностики.

Возможным решением данной проблемы является использование экспресс-методов молекулярной диагностики метастазов в ткани лимфоузла. Высокоспецифическим маркером наличия опухолевых клеток в лимфоузле является цитокератин 19 (*KRT19*). Данный белок относится к семейству кератинов и участвует в формировании структурных связей эпителиальных клеток. Высокий

уровень экспрессии мРНК *KRT19* в ткани лимфоузла, определяемый с использованием ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), является диагностическим маркером наличия метастаза (13) (14). Чувствительность данного метода является сравнимой с классическим гистологическим и иммуногистохимическим исследованием при диагностике метастазов в регионарных лимфатических узлах, что дает возможность его использования в качестве дополнительного диагностического инструмента (15).

### **Цель исследования:**

Повышение эффективности диагностики метастазов в СЛУ с использованием радиологических и молекулярно-генетических методов.

### **Задачи исследования**

1. Провести сравнительную оценку диагностических возможностей планарного сцинтиграфического исследования, гамма-сканера и ОФЭКТ-КТ в визуализации СЛУ.
2. Изучить уровень экспрессии мРНК ткане- и опухолеспецифических маркеров методом РВ-ПЦР в ткани сторожевого лимфоузла.
3. Провести оценку чувствительности и специфичности молекулярно-генетического теста, основанного на определении уровня экспрессии ткане- и опухолеспецифических маркеров сторожевого лимфоузла методом РВ-ПЦР.
4. Разработать оптимальную диагностическую модель верификации метастазов в СЛУ на основании комплексного анализа результатов радиологических и молекулярно-генетических методов исследования.

### **Научная новизна**

Впервые в работе была выполнена сравнительная оценка чувствительности/специфичности сцинтиграфического исследования СЛУ. Чувствительность метода составила 83%. Отмечена тенденция к более высокому

ИМТ в группе пациентов с отрицательным результатом, в меньшей степени на результат повлияли локализация первичной опухоли и малые размеры СЛУ, излучение от которого экранировалось избыточной подкожно жировой клетчаткой. Чувствительность использования гамма-сканера для интраоперационного поиска СЛУ составляла 87,8%. Максимальную чувствительность и специфичность в исследовании продемонстрировало ОФЭКТ-КТ (чувствительность - 99,3%).

Впервые исследованы особенности молекулярного профиля метастазов опухоли, и на основании полученных результатов разработана оптимальная диагностическая модель верификации макро- и микрометастазов в лимфоузлы на основе анализа уровня экспрессии комбинации генов ткане- и опухолеспецифических молекулярных маркеров. Показано, что соотношение уровня экспрессии цитокератина 19 и пан-лейкоцитарного маркера *CD45* имеет наилучшие диагностические характеристики для выявления метастазов в ЛУ.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Практическая значимость работы заключается в сравнительной оценке возможностей разных видов радиологических исследований: ОФЭКТ-КТ, гамма-камеры и гамма-зонда для визуализации и определения топографии СЛУ, и молекулярно-генетического метода для верификации метастаза в СЛУ. Даны характеристики факторов, влияющих на эффективность применения данных методик. Кроме того, разработан метод верификации метастазов в регионарных лимфоузлах на основе определения уровня экспрессии комбинации генов *KRT19* и *CD45*, что может стать дополнительным инструментом в морфологической диагностике рака молочной железы.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Проведение ОФЭКТ-КТ позволяет не только визуализировать СЛУ, но и определить их топографию, количество, структуру и размеры.

2. Соотношение уровня экспрессии мРНК цитокератина-19 (*KRT19*) и пан-лейкоцитарного маркера (*CD45*) в ткани лимфоузла позволяет проводить дифференциальную диагностику метастатического и интактного лимфоузла.

3. Чувствительность и специфичность комбинированной модели генов (*KRT19+CD45*) статистически значимо выше по сравнению с индивидуальными маркерами и достигает 99,2%.

### **Внедрение результатов исследований**

Результаты диссертационной работы внедрены в клиническую практику ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, все в российских рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Библиографический указатель включает 172 ссылки (4 - отечественные и 168 - зарубежных). Диссертация иллюстрирована 29 таблицами и 16 рисунками.

## **ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ МЕТАСТАЗОВ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В СИГНАЛЬНЫЕ ЛИМФАТИЧЕСКИЕ УЗЛЫ (ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР)**

В мировой статистике заболеваемость раком молочной железы в мире неуклонно растет: в 2018 году заболеваемость составила 471,5 человек на 100000 населения по сравнению с 328,8 в 2008 году (16). Однако наряду с ростом заболеваемости отмечается тенденция более раннего выявления РМЖ. В течение последних 20 лет средний размер диагностируемой первичной опухоли уменьшается на 10% каждые 5 лет (17) и в настоящее время в среднем составляет 1,8 см (18). Сегодня для большинства пациентов существует возможность выполнения органосохраняющего лечения в объеме удаления первичной опухоли с обязательным морфологическим исследованием краев резекции (туморэктомия, радикальная резекция молочной железы), с последующим проведением лучевой терапии без повышения риска рецидива по сравнению с мастэктомией (19), (20).

Еще одним важнейшим компонентом радикального лечения является оценка регионарного распространения первичной опухоли. Существует несколько возможных вариантов оценки: предоперационная оценка с использованием неинвазивных методов (пальпация, УЗИ, МРТ), патоморфологическое исследование удаленных лимфоузлов (ЛУ) - регионарная лимфаденэктомия (ЛАЭ) и биопсия «сигнального» лимфоузла (СЛУ). Концепция СЛУ предполагает, что лимфогенное метастазирование характеризуется определенной последовательностью лимфогенного распространения опухоли от коллекторов первого порядка к более отдаленным лимфатическим бассейнам. Подобная последовательность метастазирования легла в основу концепции «сигнального» (сторожевого) лимфоузла – первого лимфоузла на пути тока лимфы от опухоли (21). Отсутствие метастазов РМЖ в этом лимфоузле косвенно свидетельствует об отсутствии дальнейшего лимфогенного распространения опухоли, что позволяет отказаться от ЛАЭ во время операции (22).

Последний подход является наиболее перспективным, а в случае положительного результата биопсии СЛУ, необходимость удаления регионарных лимфатических коллекторов может считаться более обоснованной. Однако существует ряд методологических вопросов, таких как обоснование показаний, анализ характера осложнений и т. д.

## **1.1. Методы диагностики метастазов в регионарные лимфатические узлы при раке молочной железы**

### **1.1.1. Неинвазивные методы**

Наиболее простым методом диагностики регионарного метастазирования на дооперационном этапе является пальпация аксиллярной области, подключичных, надключичных, шейных и др. лимфатических узлов, в которых чаще других обнаруживаются метастатические очаги при РМЖ. Естественно, точность данного метода исследования является невысокой и колеблется в пределах 60% в зависимости от распространенности заболевания и опыта клинициста (23). Средняя оценка чувствительности составляет 35,5%, однако специфичность достигает значения 98,4% (24).

Наиболее распространенным методом визуализации регионарных, и в том числе сторожевых лимфатических узлов, является ультразвуковое исследование. Ввиду неинвазивного характера и достаточной доступности, метод получил широкое распространение в предоперационной диагностике и оценке распространенности РМЖ (25). Однако, несмотря на высокую распространенность, результаты оценки чувствительности и специфичности метода являются достаточно противоречивыми. В систематическом обзоре Soledad Alvarez et al. опубликованном в 2006, были проанализированы 16 рандомизированных исследований с целью оценки специфичности и чувствительности сонографического исследования регионарных лимфоузлов (26). Оценка данных параметров проводилась в двух группах: исследование пальпируемых и

непальпируемых внутримаммарных лимфоузлов. При использовании в качестве «золотого стандарта» морфологическое подтверждение метастатического поражения внутримаммарных лимфоузлов, чувствительность УЗИ колебалась в пределах от 54,7% (41,7% - 67,2% ДИ) до 92,3% (74,9% - 99,1% ДИ), специфичность - 80,4% (73,9% - 86,2% ДИ) - 97,1% (90,0% - 99,9% ДИ). В работах, включавших исследование только непальпируемых лимфоузлов, чувствительность составляла от 26,4% (15,3% - 40,3% ДИ) до 75,9% (56,4% - 89,7% ДИ), специфичность 88,4% (82,1% - 93,1% ДИ) - 98,1% (90,1% - 99,9% ДИ). При оценке эффективности ультразвуковой визуализации при выполнении биопсии сигнального лимфоузла чувствительность составляла от 43,5% (33% - 54,7% ДИ) до 94,9% (88,5% - 98,3% ДИ), специфичность 96,9% (91,3% - 99,4% ДИ) - 100% (96,2% - 100% ДИ).

Согласно результатам анализа работ, ультразвуковое исследование внутримаммарных и регионарных лимфоузлов отличается высокой специфичностью, что свидетельствует о достаточности сонографических признаков метастатического поражения в дифференциальной диагностике патологии лимфоузлов (27). Низкая амплитуда колебаний результатов оценки специфичности также свидетельствует в пользу этого утверждения. Этого нельзя сказать о чувствительности метода: разрешающей способности сонографической картины явно недостаточно для визуализации метастатических лимфоузлов как в случае их интрамаммарной локализации, так в иных анатомических областях: средняя оценка чувствительности колеблется с большой амплитудой в пределах 60%, то есть в 40% исследований метастатические лимфоузлы остаются незамеченными. Большой разброс значений доверительного интервала указывает на значительное влияние субъективного фактора - опыта специалиста - на результат исследования, что скорее является недостатком, чем достоинством. В целом при общей оценке эффективности методики можно сделать следующий вывод: если лимфатический узел визуализируется, то вероятность определения метастатического характера изменений является высокой, однако вероятность

обнаружения такого лимфоузла не всегда соответствует предъявляемым в клинике требованиям. Низкая чувствительность рутинно используемых клинического и ультразвукового исследования при определении метастазов в регионарные лимфоузлы не позволяет достоверно судить о распространенности метастатического процесса на предоперационном этапе (28).

МРТ является наиболее современным и гораздо менее доступным способом визуализации внутримаммарных и иных регионарных лимфоузлов. В исследовании Kvistad KA чувствительность и специфичность визуализации метастатических лимфоузлов составляла 83% и 90%, соответственно (29). Chung J. определил чувствительность и специфичность МРТ на уровне 100% и 83,3%, соответственно (30). Однако в исследовании S. A. Valente et al при сравнительном анализе УЗИ и МРТ, оба метода продемонстрировали высокую специфичность (96,2% для УЗИ и 96,7% для МРТ), хотя чувствительность МРТ (37,1%) была значительно ниже УЗИ (43,5%) (24). Эти результаты были сравнимы с данными других исследований, определивших чувствительность и специфичность МРТ в диагностике метастатических поражений регионарных лимфоузлов на уровне 36% - 78% и 93% - 100%, соответственно (31) (32) (33). Однако в метаанализе, опубликованном Harnan SE в 2011 году, чувствительность и специфичность МРТ с применением различных методов контрастного усиления составляла 90% (34).

Неоспоримым преимуществом МРТ является более высокая по сравнению с УЗИ чувствительность метода, продемонстрированная в большинстве исследований, что в сочетании с высокой специфичностью, в ряде случаев позволяет отказаться от выполнения предоперационной биопсии. При этом в публикациях с течением времени наблюдается повышение точности метода, что, вероятно, связано с модернизацией оборудования, стандартизацией методики и накоплением знаний по МРТ-семиотике онкологических заболеваний (25) (35) (36) (37) (38). Тем не менее, МРТ остается эксклюзивным методом обследования, далеким от рутинного клинического использования.

Таким образом, возможности неинвазивной диагностики метастазов в регионарных лимфатических узлах при раке молочной железы представлены клиническим методом, ультразвуковым и МРТ исследованием. Очевидно, что для обнаружения сигнального лимфоузла основным параметром является чувствительность метода, однако, как было описано ранее, она отличается высокой вариабельностью, особенно в случае клинического обследования и УЗИ, на точность которых значительное влияние оказывает субъективный фактор. Преимущество значительно более высокой чувствительности МРТ нивелируется высокой стоимостью и низкой распространенностью использования этого метода.

### **1.1.2. Радикальная лимфаденэктомия как метод стадирования регионарного распространения РМЖ**

Лимфаденэктомия является «золотым стандартом» регионарного стадирования РМЖ. ЛАЭ с середины XIX века применяется в хирургической практике в качестве неотъемлемого этапа операции с целью стадирования заболевания и контроля регионарного рецидивирования. В случае метастатического поражения регионарных лимфатических коллекторов пациент нуждается в более радикальном лечении. Классическим объемом подмышечной ЛАЭ является удаление лимфоузлов I-II уровня, однако, в 25-30% случаев существует вероятность пропустить метастатические ЛУ. С другой стороны, лимфодиссекция III уровня, как правило, считается излишней, т. к. миграция стадии наблюдается в 2-3% случаев (40) (41).

Одним из наиболее часто наблюдаемых осложнений ЛАЭ является послеоперационная лимфорея, которую можно рассматривать как «естественное» следствие намеренного пересечения и удаления подмышечного, подключичного и подлопаточного лимфатических коллекторов. В 20-90% случаев по данным разных авторов серома нуждается в дренировании (43) (44) (5) (45). Средняя продолжительность лимфореи, нуждающейся в дренировании, составляет от 6,5 до 20 дней, примерно у 16% пациентов наблюдается длительная лимфорея до 30-35

дней (46) (47) (17). Кроме того, по данным разных авторов, лимфорея повышает риск инфицирования операционной раны от 3 до 17% (48).

Одним из наиболее часто наблюдаемых осложнений ЛАЭ является лимфедема, которая так же имеет неблагоприятные социальные последствия в связи с высокой рефрактерностью к терапии и длительностью течения. Лимфедема развивается у 13-27% пациентов с РМЖ (49) (50) (51). Степень риска этого осложнения положительно коррелирует с объемом ЛАЭ, однако наблюдалось и при сохранении аксиллярного лимфатического коллектора после биопсии СЛУ. Одним из наиболее опасных осложнений хронической лимфедемы является ангиосаркома верхней конечности (синдром Стюарта-Тревиса) (52) (53).

В хирургическом поле при подмышечной лимфаденэктомии находятся такие анатомические образования, как подмышечное сосудисто-нервное сплетение, торакодорсальный, длинный грудной нерв и межреберно-плечевые нервы. Последние, как правило, повреждаются при ЛАЭ, т.к. проходят непосредственно через подмышечную жировую клетчатку и лимфатические узлы к коже подмышечной области, в связи с чем утрачивается чувствительность в подмышечной области и верхней внутренней части верхней конечности. Попытки сохранения этих нервов могут привести к развитию хронического нейропатического болевого синдрома соответствующего участка кожи. Повреждение подмышечной вены грозит геморрагическими осложнениями. Подмышечный сосудисто-нервный пучок (подмышечная артерия и плечевое нервное сплетение) относительно защищен от интраоперационного повреждения, т.к. расположен глубже и выше операционного поля. Торакодорсальный сосудисто-нервный пучок проходит вдоль наружного края широчайшей мышцы спины, в случае его повреждения развивается денервация порции широчайшей мышцы спины (развивается недостаточность внутренних ротационных движений и опущение плеча), а повреждение артерии лишает возможности выполнения пластики широчайшей мышцы спины и торакодорсальным лоскутом в дальнейшем (48). Повреждение длинного грудного нерва приводит к денервации длинной

зубчатой мышцы и крыловидной деформации лопатки. Повреждение медиального и латерального грудного нервов вызывает атрофию грудных мышц и косметический дефект (48).

Контрактура операционного шва в подмышечной области развивает менее, чем в 10% случаев. Частым проявлением контрактуры является появление тяжа из области операционного поля в направлении предплечья, редко достигающего большого пальца. Движения конечности значительно ограничены, однако состояние купируется физиотерапевтическими процедурами.

Несмотря на то, что ЛАЭ является «золотым стандартом» стадирования регионарного распространения РМЖ, риск послеоперационных осложнений и сложность хирургической техники делают актуальной проблему поиска менее радикальных способов определения лимфогенных метастазов. Наиболее перспективным решением в данной области может быть биопсия сигнального лимфоузла (55) (56).

### **1.1.3. Концепция сигнального лимфоузла**

Для рака молочной железы сигнальным считается лимфоузел, расположенный первым на пути оттока лимфы от опухоли (57). Как правило, СЛУ локализуется в ипсилатеральной подмышечной области, хотя в некоторых исследованиях авторы указывают на возможность дренирования лимфы в интрамаммарные лимфатические узлы или одновременно в интрамаммарные и подмышечные. В любом случае СЛУ являются наиболее частой мишенью на первом этапе метастазирования злокачественных опухолей. Более того, наблюдается определенная последовательность метастазирования при прогрессировании заболевания от лимфатических узлов первого порядка к узлам второго и третьего. Частота транзитных метастазов не превышает 2 – 10% (58).

Повышение качества скринингового обследования и увеличение частоты диагностики РМЖ на ранних стадиях также привело к снижению вероятности локорегионарного распространения опухоли (59). Вероятность регионарного

метастазирования опухоли диаметром менее 1 см не превышает 10% (58). В этом случае выполнение регионарной лимфаденэктомии не всегда оправдано, т.к. не несет дополнительного терапевтического эффекта и сопровождается ранними и поздними послеоперационными осложнениями (58) (57). Именно по этой причине актуален вопрос замещения лимфаденэктомии биопсией сигнального лимфоузла для оценки регионарного метастазирования, которая выполнима практически у всех пациентов (60) (55) (61).

Как было указано выше, в основе концепции СЛУ лежат анатомические предпосылки последовательного характера тока лимфы и, соответственно, распространения метастазов из зоны поражения сначала в близлежащие лимфатические узлы, затем лимфоузлы более высокого порядка. Однако представление об анатомо-морфологической структуре лимфатической системы молочной железы не является однозначным.

#### **1.1.4. Лимфатическая система молочной железы**

В молочной железе выделяют 4 лимфатических сплетения, между которыми существует большое число коммуникантных капилляров: 2 поверхностных и 2 глубоких. Поверхностные сплетения находятся в дерме (дермальное сплетение) и в субдермальном слое (подкожное сплетение). Одно из глубоких лимфатических сплетений расположено в фасции большой грудной мышцы (фасциальное сплетение) и последнее - в ткани молочной железы (дольках и протоках) - собственное сплетение молочной железы. Капилляры этого сплетения сопровождают паренхиму молочной железы вплоть до главного млечного протока, где в области ареолы посредством коммуникант соединяется с сетью дермального сплетения, образуя субареолярное сплетение (Саппея). Фасциальное сплетение соединено с подкожным сплетением через капилляры, идущие вдоль фасциальных трабекул стромы молочной железы. Реже лимфатическая система молочной железы может дренироваться через лимфатическую систему печени и субдиафрагмальное лимфатическое сплетение или сосуды передней брюшной

стенки (парамаммарный лимфатический путь Герота). Анатомические исследования продемонстрировали, что плотность поверхностной лимфатической сети значительно выше плотности глубокой сети (62) (63).

В XIX веке согласно результатам анатомических исследований путем введения ртути в лимфатическую систему молочной железы Саппей установил, что лимфа в первую очередь дренируется через поверхностные лимфатические сосуды в подмышечные лимфоузлы. Последующие исследования продемонстрировали, что Саппей был не совсем прав, т. к. существуют и другие пути дренирования. В настоящее время известно, что дренирование лимфы осуществляется через афферентные медиальные и латеральные лимфатические сосуды, которые соединены непосредственно с подмышечными или внутригрудными лимфатическими узлами.

Поверхностное лимфатическое сплетение дренируется непосредственно в подмышечные лимфатические узлы. Лимфоотток через глубокую лимфатическую сеть, как правило, осуществляется через подмышечные лимфоузлы, однако, существует и путь через внутримаммарные и внутригрудные ЛУ. Лимфоотток от молочной железы может осуществляться в парастернальные лимфатические узлы, путь, практически полностью осуществляемый глубокой лимфатической системой. Иногда лимфатические сосуды сопровождают подкожные ветви межреберных вен, впадая в задние межреберные лимфатические сосуды, расположенные рядом с суставными головками ребер. Оттуда лимфа попадает в грудной лимфатический проток. Проксимально расположенные ветви поверхностного лимфатического сплетения могут впадать через шейное сплетение в надключичные лимфатические узлы (62) (63)..

### **1.1.5. Показания и клинические аспекты биопсии СЛУ**

Клинические показания к биопсии СЛУ изменялись в течение последних лет и даже в настоящее время еще не достигнуто консолидации по некоторым вопросам. Ряд клинических центров использует биопсию СЛУ только при размере

опухоли до 3 см, тогда как другие не исключают опухоли большего размера T2-T3 (>5 см), мультицентрические и мультифокальные очаги или пациентов, получавших неоадьювантную терапию. Клинически обоснованные показания и противопоказания к биопсии СЛУ представлены в таблице 1 (64), (65), (66).

- Беременность не является абсолютным противопоказанием к биопсии СЛУ, однако, только в случае использования красителя. Использование РФП противопоказано, хотя экспозиция дозы для плода ничтожно мала (67).

- Большинство исследований эффективности и безопасности биопсии СЛУ основаны на анализе опухолей T1-T2, однако, у пациентов с опухолями большей распространенности (T3-T4) частота ложно-отрицательных результатов была сравнимой с небольшими опухолями, как и вероятность развития рецидивов в аксиллярной области (68) (69).

- Мультифокальным РМЖ считается в случае локализации нескольких опухолевых узлов более 2 см в диаметре в одном квадранте МЖ, тогда как мультицентрические очаги расположены в разных квадрантах. Частота ложноотрицательных результатов биопсии СЛУ для таких образований выше, чем для унифокальных, однако, уровень развития аксиллярных рецидивов остается низким (28) (70).

- В большинстве случаев DCIS не метастазируют в регионарные ЛУ. Однако, на этапе дооперационной диагностики 40% случаев инвазии остаются незамеченными. То есть, биопсия СЛУ может быть рекомендована пациентам, которым планируется выполнение мастэктомии, в случае органосохраняющей операции биопсия СЛУ может быть выполнена вторым этапом в случае обнаружения инвазивного характера DCIS (71).

- Гиперплазия пальпируемых подмышечных лимфоузлов в 40% случаев может иметь реактивный характер. Стандартной тактикой в данном случае является биопсия под контролем УЗИ с последующим цитологическим или морфологическим исследованием (72). Использование биопсии СЛУ может быть

оправдано в случае отрицательного результата исследования подмышечных лимфоузлов (67).

- Вероятность определения глубоких внутримаммарных лимфоузлов в значительной степени зависит от глубины введения маркера (интра- или перитуморально) (73). При использовании такой техники лимфоузлы глубокой лимфатической сети МЖ визуализируются в 30% случаев; в 60-90% из них возможно эксцизионное выделение ЛУ интраоперационно, а вероятность метастатического поражения составляет 11-27%. Тем не менее, обоснованность биопсии глубоких СЛУ остается дискуссионной (74), (75). Существуют доказательства миграции стадии РМЖ и изменения тактики лечения с использованием методов лучевой и системной терапии при использовании биопсии СЛУ, однако, доказательств влияния данного подхода на характер безрецидивной и общей выживаемости недостаточно (76).

- Повторная биопсия СЛУ может быть выполнена у пациентов с местным рецидивом при отсутствии метастазов в подмышечные ЛУ. Вероятность положительного результата может быть ниже, также чаще визуализируются экстрамаммарные пути лимфооттока. Пластические операции в анамнезе (аугментация, редукционная маммопластика) также не являются противопоказаниями к биопсии СЛУ. Хотя структура лимфооттока меняется с появлением экстрамаммарных путей после операции на молочной железе (по онкологическим или иным показаниям), выполнение биопсии СЛУ в зоне, в которой ранее выполнялась биопсия, скорее всего, будет иметь положительный результат (25) (77).

- Биопсия СЛУ до проведения неoadьювантной терапии является более чувствительной, но может затягивать начало лечения. В случае биопсии СЛУ после неоПХТ существует вероятность недооценки лимфогенной распространенности РМЖ. С другой стороны, оценка терапевтического эффекта неоПХТ имеет большое диагностическое значение, у 40% пациентов достигается полный терапевтический ответ (78) (79).

**Таблица 1.** Показания и противопоказания к биопсии СЛУ (64), (65)

<b>Клиническая ситуация</b>	<b>Рекомендации</b>
T1-T2	Не противопоказано
Пожилой возраст	Не противопоказано
Ожирение	Не противопоказано
Неoadьювантная терапия	Не противопоказано
PMЖ у мужчин	Не противопоказано
DCIS с мастэктомией	Не противопоказано
СЛУ глубокой лимфатической сети МЖ	Не противопоказано
DCIS без мастэктомии	Не противопоказано
Беременность	Доказательств недостаточно
Подозрительные пальпируемые подмышечные лимфоузлы	Доказательств недостаточно
T3-T4	Доказательств недостаточно
Мультифокальный, мультицентрический PMЖ	Доказательств недостаточно
Диагностическая или эксцизионная биопсия МЖ в анамнезе	Доказательств недостаточно
Операция МЖ в анамнезе	Доказательств недостаточно
Операция в области подмышечного лимфатического коллектора в анамнезе	Доказательств недостаточно
Воспалительная форма PMЖ	Противопоказано
Подтвержденный N1	Противопоказано
Аллергическая реакция на ингредиенты в составе красителя/коллоида	Противопоказано

В большинстве исследований биопсия СЛУ выполнялась больным РМЖ I-II стадии без клинических признаков регионарных метастазов (N0). Однако, в ряде случаев методика может быть использована и при наличии пальпируемых подмышечных лимфоузлов, в случае подозрения реактивного характера гиперплазии. Veronesi с коллегами рандомизировали 516 больных РМЖ I-II стадии на две группы: одним выполняли только биопсию СЛУ+лимфаденэктомию, другим выполняли только биопсию СЛУ (в этой группе ЛАЭ выполняли только в случае метастатического поражения СЛУ). Авторы показали, что точность биопсии СЛУ является достаточной, а частота ложноотрицательных результатов не превышает 8%. Кроме того, после биопсии СЛУ пациенты отмечали меньшую болезненность в области операции и большую подвижность верхней конечности (81), (82), (83). В исследовании не было обнаружено разницы между частотой рецидивов и безрецидивной выживаемостью. Наиболее масштабным исследованием, посвященным определению безопасности и точности биопсии СЛУ на сегодняшний день, является NSABP-32 (National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project - Национальная программа по адьювантной терапии рака молочной железы и толстой кишки) (84). Целью данного исследования было сравнение безопасности, регионарного контроля, безрецидивной выживаемости больных РМЖ при отсутствии клинических признаков регионарного метастазирования, которым выполнялась только диссекция сигнального лимфоузла или диссекция СЛУ + ЛАЭ. В исследование было включено 1975 женщин в группе биопсия СЛУ+ЛАЭ и 2008 женщин только биопсия СЛУ. Первые результаты продемонстрировали безопасность и хорошую переносимость пациентами биопсии СЛУ, частота ложноотрицательных результатов для СЛУ находилась в пределах 8 - 10%. Кроме того, течение послеоперационного периода в группе диссекции СЛУ было значительно более благоприятным по сравнению с ЛАЭ (85). Кроме того, не так давно были опубликованы результаты десятилетней выживаемости больных, принимавших участие в этом исследовании (86):

- Отсутствуют статистически значимые отличия по общей выживаемости между группами биопсия СЛУ (87,8%) и биопсия СЛУ+ЛАЭ (88,9%) (HR=1,11; p=0,27)

- Отсутствуют статистически значимые отличия по безрецидивной выживаемости между группами биопсия СЛУ и биопсия СЛУ+ЛАЭ (76,9% для обеих) (HR=1,01; p=0,92)

- Отсутствуют статистически значимые отличия по частоте появления отдаленных метастазов между группами биопсия СЛУ и биопсия СЛУ+ЛАЭ (HR=1,09; p=0,29)

- При ретроспективном патоморфологическом и иммуногистохимическом (ИГХ) исследовании у 616 из 3884 пациенток (15,8%) в СЛУ были обнаружены первоначально не описанные единичные опухолевые клетки (ЕОК) (430 случаев; 11,1%) и микрометастазы (МкМ) (172 случая; 4,4%)

- Отмечена определенная тенденция влияния ЕОК и МкМ на снижение общей 10-летней выживаемости (p=0,08), а также статистически значимое снижение длительности безрецидивной выживаемости (p=0,018)

Тем не менее, в заключении эксперты указывают на незначительное влияние ЕОК и МкМ на общую и безрецидивную выживаемость популяции исследования и не рекомендуют рутинного использования ИГХ для исследования СЛУ.

СЛУ может быть обнаружен путем контрастирования красителями, такими как метиленовый синий или сульфолан, с помощью радиоизотопного исследования, или путем комбинации этих методов (57). Некоторые авторы указывают, что время между введением контрастного препарата (или изотопа) является критическим фактором и определяет успех процедуры. С другой стороны, Stell et al. указывают на возможность определения СЛУ уже через несколько минут после введения радиофармпрепарата с сохранением эффекта в течение длительного времени (87). Это исследование опровергло опасения, высказанные ранее McMasters et al. (88) о необходимости определенного времени для миграции контрастного препарата. Использование комбинации химического красителя и

радиофармпрепарата для определения СЛУ описано в большом количестве исследований и характеризуется высокой чувствительностью и более низким уровнем ложноотрицательных результатов по сравнению с каждым методом отдельно. Koukouraki et al. оценил чувствительность и специфичность биопсии СЛУ с использованием комбинированного метода по сравнению с использованием только красителя. Авторами была выполнена биопсия 501 СЛУ (250 с использованием комбинированной методики контрастирования и 251 с использованием красителя). Пациенты были разделены на две группы: группа А - пациенты с ранней стадией РМЖ (T1-2N0), и группа В - больные распространенным РМЖ. Средняя чувствительность для определения СЛУ составляла 97,7% для группы А (95,3% - краситель, 99,3% - комбинированный метод;  $p=0,04$ ) и 96,1% для группы В (93,3% - краситель, 100% - комбинированный метод). Авторы пришли к выводу, что использование комбинированной методики повышает чувствительность определения СЛУ как в случае раннего РМЖ, так при распространенной форме заболевания (89).

#### **1.1.6. Методологические аспекты биопсии СЛУ**

В качестве маркера для визуализации СЛУ все чаще используются радиофармпрепараты (РФП). Стандартом РФП является использование коллоида, меченного  $^{99m}\text{Tc}$ . Визуализация введенного коллоида осуществляется предоперационно с использованием гамма-камеры или интраоперационно с использованием гамма-зонда. Дискутабельными остаются вопросы относительно выбора агента, размера частиц трассера, оптимального способа введения, времени до проведения сцинтиграфии и интраоперационной визуализации и необходимости включения в протокол анализа внеаксиллярных лимфоузлов.

Mariani et al. (90) предположили, что использование частиц коллоида размером 100-200 нм должно быть оптимальным. Выбор метки зависит от доступности агентов: в Европе распространен  $^{99m}\text{Tc}$ -меченный коллоид человеческого сывороточного альбумина,  $^{99m}\text{Tc}$ -сернистый коллоид чаще

используется в США. Статистически значимые отличия между использованием однодневного (визуализация в день введения) и двухдневного (визуализация на следующий день) протоколов отсутствует.

Как уже было сказано, лимфатическая система молочной железы изучена недостаточно. После 20 лет исследований большинство специалистов пришли к заключению, что введение маркера как в поверхностную, так и в глубокую лимфатическую сеть МЖ может быть эффективным. В наиболее ранних исследованиях «золотым стандартом» считалось глубокое (перитуморальное) введение маркера, относительно этого метода проводилась оценка других методик. Многие исследователи сообщали об эффективности подкожного введения маркера в проекции опухоли или пара/субареолярно. Одним из преимуществ глубокого введения маркера является возможность выявления также экстрамаммарных лимфатических коллекторов. С другой стороны, поверхностные способы введения обеспечивают быстрое распространение коллоида, лучшую визуализацию подмышечных СЛУ и не зависят от размера или возможности пальпаторного определения опухоли. Таким образом, если целью введения РФП является визуализация только аксиллярного лимфатического коллектора, то предпочтительным является поверхностный способ введения, если необходимо оценить экстрааксиллярные коллекторы, то следует выбирать перитуморальное введение (90) (91).

Лимфосцинтиграфия является основной методикой визуализации накопления РФП. Для корректной оценки сцинтиграфической картины всех возможных СЛУ, и чтобы исключить вероятность стаза коллоида в лимфатических сосудах, исследование необходимо проводить в отсроченном периоде. Лимфодренаж может быть замедленным у пожилых пациентов или пациентов с избыточным весом. Выполнение сцинтиграфии в прямой и боковой проекции может помочь в более точной локализации СЛУ (67).

Создание ОФЭКТ-КТ (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии) позволило вывести возможности лимфосцинтиграфии на новый

уровень. Информация о функциональном состоянии ткани, полученная на ОФЭКТ-КТ, может быть комбинирована с анатомической реконструированной информацией о локализации очага накопления. В результате СЛУ визуализируется на фоне индивидуального анатомического ландшафта. ОФЭКТ-КТ часто используется с целью определения как подмышечных, так и экстрааксиллярных путей лимфодренирования. ОФЭКТ-КТ также может обнаружить «горячие» узлы, пропущенные при планарной сцинтиграфии вследствие наложения изображений, особенно у тучных пациентов (92) (49).

Дифференциальная диагностика истинного СЛУ от других лимфатических узлов на сцинтиграмме может быть затруднительной. Кроме того, у пациента может определяться более одного СЛУ.

Что касается ОФЭКТ-КТ, то в большинстве случаев этот метод позволяет определить СЛУ путем получения ранних и отсроченных сцинтиграмм. Большинство современных протоколов рекомендуют выполнение отсроченного исследования (спустя 2-4 часа после введения РФП). Однако необходимым является определение критериев определения СЛУ при предоперационном исследовании. Основным критерием является одновременная визуализация лимфатических протоков, время появления изображения ЛУ, бассейн лимфатического узла и интенсивность накопления коллоида (93), (94). В соответствии с этими критериями, ЛУ, в зависимости от характера визуализации, могут быть классифицированы следующим образом:

- Определенно СЛУ – лимфатические узлы, в которые непосредственно дренируется лимфа из области опухоли через собственные сосуды или единственный радиомеченный ЛУ в зоне лимфатического бассейна опухоли.
- Вероятно СЛУ – лимфатические узлы, визуализируемые между зоной введения РФП и первым дренирующим ЛУ или ЛУ повышенной интенсивности в соседних областях.
- Вероятно, не СЛУ – все ЛУ следующих эшелонов лимфатического коллектора.

Использование подобной классификации в клинике позволит облегчить процесс принятия решений. Лимфоузлы, отнесенные в первые две категории, должны быть удалены во время операции. Другие ЛУ могут быть удалены в зависимости от относительного уровня интенсивности радиоизлучения по оценке гамма-зонда (95).

Использование портативного гамма-зонда позволяет проводить интраоперационный поиск «горячих» лимфоузлов. Непосредственная детекция очагов радиоактивности позволяет в режиме реального времени планировать хирургическую тактику, а также контролировать удаление СЛУ путем определения интенсивности излучения (95, 96). При этом в ряде исследований не было отмечено статистически значимой разницы по количеству определяемых СЛУ между ОФКТ и гамма-зондом (98).

Характер осложнений, развивающихся после биопсии СЛУ, мало отличается от ЛАЭ (лимфедема, серома, нейросенсорные нарушения), однако, вероятность их развития значительно ниже. Данные долгосрочного наблюдения больных после биопсии СЛУ без последующей ЛАЭ свидетельствуют о том, что вероятность развития риска осложнений в целом не превышает 7% (99, 100, 101, 102). В частности, Wilke с коллегами при анализе 5327 пациентов после биопсии СЛУ описал инфицирование раны в 1%, развитие серомы в 7%, подмышечной гематомы в 1,6% и лимфорей в 6,9% наблюдений (96). Частота развития аллергических реакций на введение коллоида или красителя составляет от 0,5 до 2% (103, 104, 105).

Таким образом, техника биопсии СЛУ при наличии показаний обеспечивает значительные преимущества в отношении риска развития осложнений, сокращает длительность послеоперационного периода с соответствующими социально-экономическими последствиями.

После двух десятилетий использования техник биопсии СЛУ методика вошла в стандарты предоперационного стадирования локорегионарного распространения РМЖ. Однако, остается еще много нерешенных вопросов, как и

нет единого стандарта техники биопсии. Однако использование новых технологических подходов позволяет значительно оптимизировать визуализацию СЛУ.

### **1.1.7. Лабораторные методы диагностики метастазов в сигнальные лимфатические узлы**

#### **1.1.7.1. Морфологические методы исследования сигнальных лимфатических узлов**

Целью двух больших клинических исследований, выполненных в рамках National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP - Национальная программа по адьювантной терапии рака молочной железы и толстой кишки) и American College of Surgeons Oncology Group (ACOSOG - Онкологическая группа Американской хирургической коллегии), была оценка возможности клинического использования и точности биопсии сигнального лимфоузла. Если техника визуализации сигнального лимфоузла, как уже было описано ранее, достаточно детально описана и известны достоинства и недостатки основных методов контрастирования, то методология патоморфологического исследования СЛУ является дискуссионной, ввиду отсутствия стандартизованного протокола. Бесспорным остается факт: чем больше срезов СЛУ исследовано, тем больше вероятность обнаружения метастаза (106, 107, 108, 109, 110, 111, 112). Однако морфологическая верификация является субъективной и не всегда однозначно трактуется даже экспертами (113, 114) (таблица 2). Также дискуссионным является вопрос относительно размера метастаза в лимфоузле, имеющем диагностическое значение. В частности, Американский объединенный онкологический комитет (American Joint Committee on Cancer) предлагает для стадирования рака различной локализации использовать следующую классификацию размера метастазов:

- макрометастаз - размер очага более 2 мм
- микрометастаз - размер очага 0,2 - 2 мм

- изолированные опухолевые клетки

Существует закономерная зависимость между объемом метастатического поражения СЛУ и вероятностью дальнейшего лимфогенного распространения метастазов (115, 116, 117, 118) (таблица 3).

Стандартом объема хирургического лечения в случае обнаружения метастазов в СЛУ является выполнение подмышечно-подключично-подлопаточной лимфаденэктомии. В том случае, если диагноз метастаза в СЛУ установлен интраоперационно, хирург выполняет ЛАЭ одномоментно (97), (98).

**Таблица 2.** Вероятность верификации метастаза в СЛУ в зависимости от объема морфологического исследования

Автор, Год	Изменение кол-ва срезов	Повышение частоты верификации метастаза, %
Treseler & Tauchi, <sup>6</sup> 2000	Мультидисциплинарный обзор	9–33
Yared et al, <sup>7</sup> 2002	Один срез 5-мкм и 10 срезов 5-мкм	10
Liu et al, <sup>8</sup> 2000	1 срез и 3 среза (гематоксилин-эозин и ИГХ)	19
Cserni, <sup>9</sup> 2002	5 срезов по мкм (через каждые 50-100 мкм) и анализ всех срезов СЛУ в пределах 250 мкм	19–28
Pargaonkar et al, <sup>10</sup> 2003	Один срез 5 мкм и 2 ГЭ и 3 ИГХ среза толщиной 5 мкм	8
Motomura et al, <sup>11</sup> 2002	Один срез 5 мкм и 1 срез ГЭ через каждые 2 мм с дополнительным ИГХ исследованием	16
Groen et al, <sup>12</sup> 2007	1 срез для половины лимфоузла и 3 среза через каждые 150 мкм половины лимфоузла	12,5

Методы фиксации ткани парафином для патоморфологического исследования, рутинно используемые в настоящее время, не лишены некоторых недостатков. Исследование гистологических срезов, окрашенных гематоксилин-эозином, требует предварительной фиксации. Данная методика, обладая высокой диагностической специфичностью (99-100%) и чувствительностью (85-90%), требует достаточно длительного времени для подготовки образца. Кроме того, чувствительность метода зависит от толщины среза. К сожалению, в настоящее время не разработано единого алгоритма патоморфологического исследования СЛУ (99). Невозможно произвести оценку большого количества срезов СЛУ для повышения чувствительности метода, и на практике исследованию подвергается не более 2-5% ткани ЛУ. Фиксация ткани требует времени и по этой причине не может быть выполнена интраоперационно. Проведение качественного гистологического исследования зависит от квалификации патоморфолога, и тем не менее остается субъективным. Иммуногистохимическое исследование может быть использовано в дополнение к гистологическому исследованию СЛУ, в основном с целью обнаружения специфических маркеров эпителиальной ткани, в частности, цитокератинов, но метод также далеко не во всех лабораториях адаптирован для этих целей (97), (100).

**Таблица 3.** Вероятность верификации метастазов в других лимфоузлах при наличии/отсутствии метастазов в СЛУ (по результатам патоморфологического исследования).

<b>Размер метастаза в СЛУ, мм</b>	<b>Вероятность верификации метастазов в других лимфоузлах, %</b>
>2 (макрометастаз)	45–79
0.2 < 2 (микрометастаз)	10–25
<0.2 (единичные опухолевые клетки)	7–15
Нет метастазов	~10

В качестве методов интраоперационного исследования СЛУ можно упомянуть патоморфологическое исследование замороженных срезов и цитологическое исследование мазков-отпечатков. Исследование замороженных срезов характеризуется умеренной чувствительностью (57-74%) и высокой специфичностью (99-100%) (120, 121, 122, 123, 124). Методика может только приблизительно определить размер метастаза, однако быстрота выполнения (от 10 до 30 минут) позволяет использовать ее интраоперационно. Как и для исследования парафинизированной ткани, так и для анализа замороженных срезов не разработано стандартизованных протоколов (101), (102). Низкая чувствительность связана с ограниченным количеством исследуемого образца, потерей части материала на лезвии микротомов, сокращением времени окрашивания, в связи с чем интерпретация гистологической картины становится еще более субъективной, чем при анализе парафинизированной ткани. Кроме того, диагностика некоторых форм рака, в частности, долькового рака молочной железы, в целом является затруднительной. Как и исследование замороженных срезов, цитологическое исследование мазков-отпечатков ЛУ характеризуется умеренной чувствительностью (45-63%), но высокой специфичностью (98-100%) (124, 125, 126, 127) (Таблица 4). Кроме того, цитологическое исследование также, как и гистологическое исследование парафинизированной ткани и свежезамороженных срезов не лишено недостатков: субъективность оценки, низкая чувствительность в случае долькового рака молочной железы и невозможность определения размера метастатического очага. В метаанализ, посвященный цитологическому исследованию сигнального лимфоузла, было включено 31 исследование. Средняя чувствительность метода составляла 63% (95% доверительный интервал: 57-69%), специфичность 99% (95% доверительный интервал: 98-99%), наибольшее число ложноотрицательных результатов отмечено для микрометастазов и долькового рака молочной железы (104).

**Таблица 4.** Чувствительность и специфичность экспресс-методов интраоперационной верификации метастазов в СЛУ

Автор/Год	Количество наблюдений	Метод	Чувствительность, %	Специфичность, %
Veronesi et al, 1997	107	Исследование замороженных срезов	64	100
Rahusen et al, 2000	106		57	100
Chao et al, 2002	203		68	99
Tanis et al, 2001	262		74	99
Creager, 2002	646	Цитологическое исследование мазков-отпечатков	53	98
Dabbs, 2004	748		45	99
Guldroz, 2010	387		63	99
Komenak, 2010	107	Исследование замороженных срезов	74	100
		Цитологическое исследование мазков-отпечатков	61	100

#### 1.1.7.2. Молекулярные маркеры в диагностике метастазов в СЛУ

Результаты молекулярно-биологических исследований сигнального лимфоузла в диагностике метастазов РМЖ стали появляться в научной литературе в конце 1990-х годов и в основном были посвящены поиску подходящих маркеров метастатической инвазии. Молекулярный анализ сигнального лимфоузла, как правило, представляет собой оценку экспрессии соответствующих генов на уровне мРНК (матричной РНК). Так как в каждой клетке организма содержится идентичный набор хромосом (ДНК), разнообразие фенотипической картины

различных тканей связано с активацией (транскрипцией) различных генов, что формирует индивидуальный портрет экспрессии мРНК и соответствующего белка. Теоретически, обнаружение мРНК генов, экспрессирующихся эпителиальным ростком клеток молочной железы и интактных в ткани лимфоузла, может быть следствием присутствия инородных клеток - метастазов рака молочной железы.

Молекулярный анализ СЛУ состоит из нескольких этапов: выделение и очистка тотальной мРНК из гомогенизированной ткани СЛУ с последующим анализом экспрессии определенных генов. Методика ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) позволяет *in vitro* синтезировать (амплифицировать) большое количество копий определенного гена с последующей детекцией с использованием гель-электрофореза или оценки уровня флуоресценции (ПЦР в реальном времени - РВ-ПЦР).

В 1994 году Schoenfeld с коллегами опубликовал первое сообщение, в котором указывал, что молекулярный маркер цитокератин-19 (*KRT19*) позволяет с достаточной чувствительностью и специфичностью определять клетки метастазов рака молочной железы в СЛУ (105). Предложенный авторами алгоритм определения экспрессии *KRT19*, включавший ОТ-ПЦР с последующей детекцией амплифицированной кДНК гель-электрофорезом, превосходил по своей чувствительности ИГХ исследование. Noguchi с коллегами определил, что анализ экспрессии генов *KRT19* и *MUC-1* методом РВ-ПЦР в экспериментальной модели позволяет определить  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  клеток, соответственно (106). В группе из 56 пациентов экспрессия *KRT19* и *MUC-1* была определена в 7 морфологически интактных лимфоузлах, а в одном метастатическом по данным гистологического исследования лимфоузле экспрессии не было.

Оба этих исследования, также как и ряд последующих (107) (108), доказывают, что чувствительность молекулярно-биологического анализа может быть выше гистологической оценки. С другой стороны, высокая чувствительность метода может стать причиной появления ложноположительных результатов: не

исключено, гены, выбранные для дифференциальной диагностики метастаза, экспрессируются на минимальном уровне и в ткани лимфоузла (109).

Большие надежды в решении проблемы повышенной чувствительности возлагались на меланома-ассоциированный антиген-3 (MAGE-A3), экспрессирующийся исключительно в ткани рака молочной железы. Однако, согласно результатам исследования Wascher с коллегами, экспрессия этого гена наблюдалась только в 45% метастатических по результатам гистологического исследования лимфоузлов (110). В силу низкой чувствительности дальнейшее изучение этого гена в качестве молекулярного маркера было прекращено. К сожалению, в настоящее время не существует абсолютно специфических маркеров метастатического поражения лимфоузлов при раке молочной железы.

В 2001 году Manzotti, используя 146 образцов СЛУ, полученных от 123 пациентов, провел сравнительное исследование чувствительности и специфичности анализа экспрессии пяти генов и гистологического исследования замороженных срезов (анализировались два последовательных среза, взятые через 50-100 мкм при исследовании всего объема ткани лимфоузла). Для молекулярного анализа была отобрана ткань лимфоузла между соседними срезами. Чувствительность и специфичность молекулярных маркеров варьировала в широких пределах; максимальную специфичность продемонстрировал *MUC-1* (100%), однако его чувствительность была наименьшей, маммаглобин (*MGB1*) характеризовался наиболее привлекательным сочетанием специфичности (86%) и чувствительности (77,8%). Авторы пришли к выводу, что использование мультигенетической модели РВ-ПЦР позволяет достичь максимальной конкордантности с детальным гистологическим исследованием. Однако, авторы также отмечают, что необходим дальнейший проспективный мониторинг больных для определения клинического значения модели (111).

Во всех описанных выше работах для определения ПЦР продукта использовалась методика гель-электрофореза, и эти методы обеспечивают лишь качественную оценку экспрессии. Альтернативным подходом является

использование метода ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), отличающегося высокой воспроизводимостью и возможностью получения количественной оценки. Последнее свойство метода решает проблему дискриминации между базовым уровнем экспрессии гена в норме и его патологической активностью, в частности, в метастатическом очаге.

В 2003 году Inokuchi выполнили исследование 358 лимфоузлов, полученных от 22 пациентов, с использованием РВ-ПЦР. Экспрессия *KRT19* была оценена относительно экспрессии гена с конститутивным уровнем экспрессии. Первой задачей было сравнение уровня экспрессии *KRT19* в интактном и метастатическом по данным гистологического исследования лимфоузле. Согласно методу, экспрессия *KRT19* была обнаружена в 100% метастатических и 9% интактных лимфоузлах; кроме того, *KRT19* экспрессировался в 3 из 4 гистологически интактных, но ИГХ метастатических лимфоузлах (112). Это и ряд других исследований (113) (114) положили начало использования метода РВ-ПЦР для определения метастазов в СЛУ, доказав, что метод обладает высокой воспроизводимостью и, кроме того, дает количественную оценку экспрессии. Современные работы подтверждают полученные ранее данные (115).

Gillanders (116) с коллегами и Mikhitarian (117) с коллегами опубликовали сообщения о некоторых результатах исследования MIMS (Minimally Invasive Molecular Staging of Breast Cancer - Минимально инвазивные методы молекулярного стадирования рака молочной железы). В это мультицентровое исследование, в котором РВ-ПЦР использовался для молекулярного определения метастазов в СЛУ и других лимфоузлах, было включено 489 пациентов. Согласно результатам исследования, чувствительность комбинированного гистологического и молекулярного методов составила 92,8% по сравнению с 84% только для гистологического исследования.

Другой важной особенностью РВ-ПЦР является возможность использования этого метода в условиях интраоперационной диагностики в связи с высокой скоростью детекции. Raja с коллегами (118) и Hughes с коллегами (119) сообщили

о создании совместно с компанией Cepheid (Sunnyvale, CA, USA) полностью автоматизированной системы молекулярного определения метастазов в СЛУ. Этапы гомогенизации ткани СЛУ, фильтрации, дальнейшего процессинга выделенной РНК полностью автоматизированы, в качестве мишени используются 2 гена TACSTD1 и PIP, уровень экспрессии которых определяется относительно рефересных конститутивных генов. В своем последнем сообщении (119) авторы сообщили о проведении испытаний оценки прецизионности метода, однако информации о клинической информативности метода пока нет.

### **1.1.7.3. Интраоперационный экспресс анализ экспрессии генов для оценки метастатического поражения СЛУ**

В 2007 году Tsujimoto с коллегами опубликовали сообщение об использовании новой методики, получившей название OSNA (One step nucleic acids amplification - одноэтапная амплификация нуклеиновых кислот), для обнаружения и количественного определения мРНК цитокератина-19 в ткани лимфоузлов у больных раком молочной железы. В основе OSNA лежит технология, разработанная в 2000 году и называемая петлевая изотермальная амплификация с обратной транскрипцией (120). Согласно методу, ткань лимфоузла гомогенизируется в растворе, в котором одновременно происходит детекция мРНК цитокератина-19. В процессе амплификации молекулы-мишени образуются большое количество ионов  $Mg^{2+}$ , которые выпадают в осадок, изменяя мутность раствора. В статье авторы определяют границы уровня амплификации для дифференциальной диагностики макро-, микрометастаза и единичных опухолевых клеток (120). Для анализа использовались замороженные срезы лимфоузла. Через каждые 10 мкм исследуемого лимфоузла отбирались срезы для гистологического и ИГХ исследования, ткань лимфоузла между этими срезами отбиралась для молекулярного анализа. В качестве нижней границы молекулярного определения макрометастаза авторы определили концентрацию мРНК *KRT19*  $5 \cdot 10^3$  копий на мкл;  $2,5-5 \cdot 10^3$  копий на мкл для микрометастаза. Концентрация мРНК менее

$2,5 \cdot 10^3$  копий на мкл соответствовала интактному лимфоузлу (120). В исследованиях по валидации метода, проведенных в 2007 году, сообщается о 98% соответствии результатов анализа детальному гистологическому и ИГХ исследованию (120), по результатам исследования 2009 года это значение составило 93% (15). Несмотря на использование только одного гена в качестве мишени и отсутствие гена внутреннего контроля Tamaki с соавторами добились 94,3% специфичности и 87,7% чувствительности в мультицентровом исследовании на территории Японии, включавшем 164 пациента. Учеными проведена оценка OSNA в исследовании, включавшем 32 пациента на территории Нидерландов, и определили специфичность 95,3% и чувствительность 94,7% (122). Похожие результаты были получены Schem в Германии (123). Проспективное исследование OSNA длительностью 2 года было проведено в США с 2007 по 2008 год, о результатах которого сообщил Feldman (15) на встрече Американской ассоциации онкомаммологов в 2010 году. В исследовании, в которое были включены 496 пациентов и исследовано в общей сложности 1044 СЛУ, чувствительность и специфичность OSNA 82,7% и 97,7%, соответственно. Результат в 95,8% соответствовал детальному морфологическому исследованию. Неоспоримыми достоинствами OSNA являются высокая скорость и относительная простота анализа, к существенным недостаткам можно отнести высокую вероятность ложноотрицательного результата в случае *KRT19* неэкспрессирующих опухолей. OSNA также позволяет проводить косвенную оценку размера метастаза на основе количественной оценки копий мРНК *KRT19*, что может позволить хирургу интраоперационно принимать решение об объеме лимфаденэктомии.

Перед созданием OSNA Backus с коллегами опубликовали результаты исследования, целью которого было создание оптимальной панели генетических маркеров для верификации метастазов рака молочной железы в СЛУ (124).

В рамках первоначального исследования были использованы технологии определения полногеномной экспрессии, а также анализ экспрессии 7 гипотетических генов-кандидатов и одного референсного гена. После

исследования различных комбинаций генов на моделях метастатических и интактных лимфоузлов, авторы определили сочетание маркеров цитокератин-19 и маммаглобин (MGB), характеризующееся наиболее высокой чувствительностью и специфичностью, равную 94%. Порфобилиногендеаминаза (PBGD) была выбрана в качестве референсного гена в связи с постоянным уровнем экспрессии в ткани лимфоузлов.

Следом за этим исследованием было проведено многоцентровое клиническое испытание, реализованное в два этапа, для которых были поставлены различные цели. Первый этап проводился с июля 2004 по декабрь 2005 года и включал 304 пациентов. В рамках этого этапа были определены клинически значимые границы экспрессии *KRT19* и MGB. На втором этапе в исследование были включены 411 пациентов, целью исследования была клиническая валидация метода (158, 159, 160). По результатам исследования было правильно определено 98% метастазов размером более 2 мм и 88% метастазов размером более 0, 2 мм. Микрочастицы определялись гораздо реже - менее, чем в 57% случаев. Количество ложноположительных результатов (положительное определение экспрессии в морфологически интактных лимфоузлах) составило 4%.

Результаты вышеописанного исследования свидетельствуют о том, что чувствительность метода молекулярного определения СЛУ характеризуется низким процентом ложноположительных результатов и не приводит к выполнению излишнего количества радикальных лимфаденэктомий. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях (Таблица 5) (125) (126) (127). Дизайн всех исследований был похожим, авторы использовали результаты РВ-ПЦР для определения метастазов в СЛУ для выбора клинической тактики лечения, однако не все из них применяли метод интраоперационно.

Большинство исследователей пришли к заключению, что молекулярное определение метастазов в СЛУ характеризуется экстремально высокими значениями чувствительности, на уровне 98-100%. Воспроизводимость метода также была высокой, что подтверждено результатами исследования (128) и, кроме

того, метод продемонстрировал высокое значение диагностической ценности отрицательного результата - 96% (128).

**Таблица 5.** Чувствительность и специфичность методов молекулярного определения метастазов в СЛУ в клинической практике

Автор	Страна	Кол-во пациентов, чел.	Чувствительность, %	Специфичность, %
Viale et al, 2008	Милан, Италия	293	77.8	95.0
Veys et al, 2009	Брюссель, Бельгия	367	89.0	94.5
Mansel et al, 2009	Кардиф, Великобритания	82	88.9	94.6
Cutress et al, 2010	Портсмут, Великобритания	254	96.0	95.0
Tafe et al, 2010	США	57	88.9	93.5
Blumencranz et al.	США	478	95.0	93.0

Так как в основе метода лежит использование ПЦР в реальном времени, технология способна давать не только категориальную (в формате да/нет), но и количественную диагностическую оценку. Хотя визуализация результатов реакции является опосредованной, т. к. оператор не наблюдает непосредственно амплифицируемые мишени. Результатом реакции является увеличение флуоресценции, пропорциональное количеству мишени, а непосредственным динамическим отражением - график экспоненты увеличения флуоресценции соответствующей мишени, пересечение которого с базовой линией уровня шума называется пороговым циклом. Именно это значение отражает уровень экспрессии соответствующего гена. В исследованиях, проведенных Veys с коллегами (108) и Viale с коллегами (129), авторы указывают на наличие обратной корреляции между размером метастатического очага и уровнем экспрессии *KRT19* и *MGB*.

Исследование (130) приводит аналогичные результаты ( $r = -0.74$  для MG и  $-0.72$  для СК19,  $P < .0001$ ). Таким образом, методике молекулярного определения метастазов СЛУ доступна как категориальная, так и количественная диагностическая оценка метастазов.

Таким образом, при высоком уровне специфичности молекулярные методы определения метастазов в СЛУ характеризуются также и высокой чувствительностью, что отличает их от морфологического и иммуногистохимического исследования. Значения уровней экспрессии генов-мишеней в макрометастазе и интактном лимфоузле отличается на несколько порядков, что делает метод достаточно устойчивым к вариациям количества клеток опухоли в исследуемом материале. Также возможность количественной оценки уровня экспрессии позволяет регулировать границы группы МТС+ в широком диапазоне, включающем или исключаящем микрометастазы или единичные опухолевые клетки в зависимости от требований клиницистов.

Таким образом регионарное распространение РМЖ, безусловно, влияет на выбор тактики лечения пациентов, в связи с чем методам оценки лимфогенной диссеминации опухоли уделяется большое внимание. Однако, единого взгляда на алгоритм и клиническую значимость результатов при использовании методов оценки диссеминации опухоли нет. Неинвазивные методы диагностики (УЗИ, МРТ) при высокой специфичности обладают весьма низкой чувствительностью, что не позволяет сделать окончательного заключения о степени метастатического распространения опухоли на предоперационном этапе. С другой стороны, «золотой стандарт» регионарной ЛАЭ, давая исчерпывающее представление о степени регионарной диссеминации, связан с высоким риском послеоперационных осложнений при отсутствии критериев отбора, что делает необходимым выполнение операции всем пациентам. Информацию о предполагаемой пользе и, соответственно, необходимости ЛАЭ может дать биопсия СЛУ. Разработаны высокочувствительные методы визуализации и детекции СЛУ, а использование молекулярных методов исследования специфических маркеров позволяет

определять любой объем поражения СЛУ, от единичных опухолевых клеток до макрометастазов. Появление возможности верификации единичных опухолевых клеток в ткани лимфоузла с использованием прецизионных молекулярных диагностических методов поставило вопрос о клиническом значении микрометастазов и т. н. "молекулярных" метастазов СЛУ.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Описание обследуемых групп

В исследование было включено 152 больных раком молочной железы, у которых на дооперационном этапе, по данным клинико-инструментальных методов обследования, не были выявлены признаки метастатического поражения регионарных лимфоузлов. Средний возраст пациенток составил 52,4 года (от 25 до 80 лет). В таблице 6 представлено количество пациенток в различных возрастных группах

Таблица 6. Распределение больных раком молочной железы по возрасту

Возрастной интервал, лет	Количество пациенток, чел. (%)
20-30	2 (1,3)
30-40	14 (9,3)
40-50	36 (23,6)
50-60	59 (38,8)
60-70	29 (19,1)
70-80	9 (5,9)
80-90	3 (1,9)

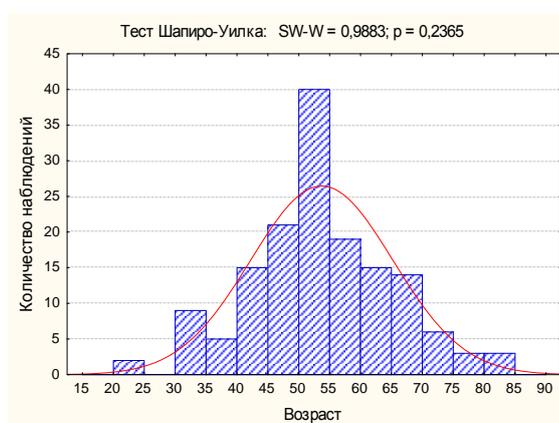


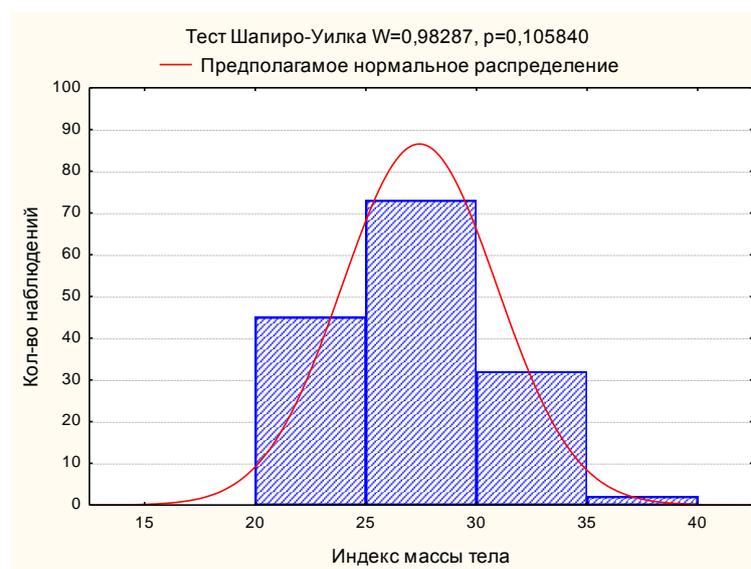
Рисунок 1. Распределение обследуемых пациентов по возрасту

Диаграмма на рисунке 1 демонстрирует нормальность распределения возраста в исследуемой группе пациентов.

Средний индекса массы тела у обследованных пациенток составлял  $27,4 \pm 3,5$ . В таблице 7 представлено количество и процентное соотношение пациенток в зависимости от ИМТ.

**Таблица 7.** Распределение больных раком молочной железы в зависимости от ИМТ

<b>ИМТ</b>	<b>Количество пациенток, чел. (%)</b>
<b>20-25,0</b>	45 (29,6)
<b>25,1-30,0</b>	73 (48,0)
<b>30,1-35,0</b>	32 (21,1)
<b>35,1-40,0</b>	2 (1,3)



**Рисунок 2.** Распределение индекса массы тела у обследованных пациентов

Наиболее частым объемом хирургического лечения была мастэктомия, которая выполнялась в 122 случаях (80,4%), реже выполнялась квадрантэктомия (10,9%) и другие виды хирургического лечения (8,7%). В таблице 8 представлено

количество и процентное соотношение пациенток в зависимости от объема хирургического лечения.

**Таблица 8.** Распределение пациенток в зависимости от объема хирургического лечения

<b>Объем операции</b>	<b>Количество пациенток, (%)</b>
Мастэктомия с ЛАЭ	122 (80,4)
Квадрантэктомия с ЛАЭ	17 (10,9)
Другие виды операции*	13 (8,7)

\* - подкожная мастэктомия, широкая секторальная резекция и др.

У пациентов, включенных в исследование, были изучены следующие клинико-морфологические характеристики заболевания:

Локализация первичной опухоли. В 75 из 152 случаев (49,3%) опухоль локализовалась в правой молочной железе, в 77 (50,7%) - в левой. Не было обнаружено закономерностей локализации опухоли в левой или правой молочной железе ( $p=0,88$ ). В большинстве случаев (57,2%) опухоль локализовалась в верхненаружном квадранте, реже - в нижне-наружном (20,4%), внутренних квадрантах (15,8%) и центральном секторе (6,5%). Количество и процентное соотношение пациенток в зависимости от локализации опухоли представлено в таблице 9.

**Таблица 9.** Распределение пациенток в зависимости от локализации опухоли

<b>Локализация</b>	<b>Количество пациенток. (%)</b>
ВНК	87 (57,2)
ННК	31 (20,4)
ВВК	12 (7,9)
НВК	12 (7,9)
ЦС	10 (6,5)

ВНК - верхненаружный квадрант; ННК - нижненаружный квадрант; ВВК - верхневнутренний квадрант; НВК - нижневнутренний квадрант; ЦС - центральный сектор

Размер первичной опухоли в среднем составлял  $2,2 \pm 1,2$  см (Т2). В целом у 65 пациентов (42,8%) размер опухоли колебался от 0,5 до 2 см, у 80 (52,6%) от 2,1 до

5,0 см., у 7 (4,6%) - более 5 см. Пациенты, у которых наблюдалось прорастание опухоли кожи или передней грудной стенки (T4a) или отечно-инфильтративные формы (T4b), были исключены из исследования. Количество пациентов в зависимости от размера опухоли приведено в таблице 10.

**Таблица 10.** Распределение пациентов в зависимости от размера опухоли

<b>Размер опухоли</b>	<b>Количество пациенток, чел. (%)</b>
T1 (0,5-2,0 см)	65 (42,7)
T2 (2,1-5,0 см)	80 (52,7)
T3 (более 5,0 см)	7 (4,6)

Также у 18 из 152 пациентов (11,8%) был отмечен мультицентрический рост опухоли.

Локо-регионарное распространение опухоли. Пациенты, у которых на предоперационном этапе наблюдались признаки метастатического поражения регионарных лимфатических узлов и наличие метастазов было подтверждено по результатам цитологического исследования, были исключены. Всем остальным пациентам выполнялась лимфаденэктомия в стандартном объеме вне зависимости от результатов биопсии СЛУ. Согласно результатам патоморфологического исследования, метастазы в подмышечных лимфоузлах отсутствовали у 86 пациентов (56,6%). Метастатическое поражение регионарных лимфоузлов обнаружено у 66 пациенток. От одного до трех метастатических лимфоузлов встретились у 36 (23,7%), от четырех до девяти - у 26 (17,1%) и более девяти - у 4 (2,6%) пациентов. Отсутствие признаков метастатического поражения регионарных лимфоузлов у данных пациентов на этапе обследования связано с наличием в поражённых лимфоузлах микрометастазов, единичных опухолевых клеток и небольшими размерами самих лимфатических узлов. В таблице 11 представлено количество пациентов в зависимости от метастатического поражения регионарных лимфоузлов.

Непосредственный подсчет количества метастатических лимфоузлов, а также анализ соотношения числа удаленных к числу метастатических лимфоузлов может

позволить не только более детально оценить степень регионарной распространенности метастатического процесса, но и адекватность объема регионарной лимфаденэктомии.

**Таблица 11.** Распределение пациентов в зависимости от метастатического поражения регионарных лимфоузлов

<b>Метастазы в регионарных лимфоузлах (TNM)</b>	<b>Количество пациентов, чел. (%)</b>
N0	86 (56,6)
N1 (1-3 метастазов в регионарных лимфоузлах)	36 (23,7)
N2 (4-9 метастазов в регионарных лимфоузлах)	26 (17,1)
N3 (более 9 метастазов в регионарных лимфоузлах)	4 (2,6)

В таблицах 12, 13 представлено распределение пациентов в зависимости от количества метастатических лимфоузлов и соотношения числа удаленных к числу метастатических лимфоузлов.

**Таблица 12.** Распределение пациентов в зависимости от количества метастатических лимфоузлов

<b>Количество метастатических лимфоузлов</b>	<b>Количество пациентов, чел. (%)</b>
0	86 (56,6)
1	16 (10,5)
2	11 (7,2)
3	9 (5,9)
4	7 (4,6)
6	5 (3,3)
7	9 (5,9)
8	5 (3,3)
11	2 (1,3)
18	2 (1,3)

**Таблица 13.** Распределение пациентов в зависимости от количества удаленных лимфоузлов

<b>Количество удаленных лимфоузлов</b>	<b>Количество пациентов, чел. (%)</b>
8-10	57 (37,7)
11-12	31 (20,1)
13-14	19 (12,3)
15-16	15 (9,6)
17-18	11 (7,9)
19-20	15 (9,6)
21-22	4 (2,6)

Так как распределение количества метастатических лимфоузлов в исследуемой популяции не было нормальным (критерий Шапиро-Уилка,  $p < 0.001$ ), описание наиболее характерных проводилось с использованием непараметрической статистики (медиана; 25-й и 75-й процентиля).

Таким образом, в исследуемой популяции пациентов с регионарным метастатическим распространением медиана количества пораженных лимфоузлов составляла 2,5, а 25 и 75 процентиля соответствовали 1 и 7 метастатическим лимфоузлам. Из данного анализа намеренно были исключены образцы N0 с целью обеспечить адекватность результатов именно при наличии метастатического поражения, т.к. именно в этом случае важно оценить адекватность объема лимфаденэктомии.

Медиана количества удаленных лимфоузлов равна 12, 25 перцентиль соответствует 9, а 75 перцентиль - 15 удаленным лимфоузлам. Медиана соотношения количества удаленных к количеству метастатических лимфоузлов равна 3, 25-й и 75-й процентиля 1,85 и 9, соответственно. В таблице 14 представлены сводные данные по статистике количества метастатических лимфоузлов, удаляемых лимфоузлов и соотношению метастатических/удаляемых лимфоузлов.

**Таблица 14.** Распределение пациентов в зависимости от соотношения числа удаленных к числу метастатических лимфоузлов

<b>Параметр</b>	<b>Медиана</b>	<b>25-й процентиль</b>	<b>75-й процентиль</b>
Количество метастатических лимфоузлов	2,5	1	7
Количество удаляемых лимфоузлов	12	9	15
Метастатические/удаляемые лимфоузлы	3	1,85	9

Результаты, описанные выше, являются, на наш взгляд, основой для проведения дальнейшего анализа. Приведенные в таблице цифры демонстрируют адекватность объема лимфаденэктомии объему метастатического поражения.

Естественно, объем ЛАЭ отчасти является субъективным параметром, т. к. интраоперационная картина характера метастатического распространения опухоли позволяет хирургу в определенных пределах варьировать степень лимфодиссекции. В этом случае тем более важно понимать, что при отсутствии видимых признаков метастатического поражения регионарных лимфоузлов, объем операции является достаточным для обеспечения радикального удаления опухоли. По нашим данным количество удаляемых лимфоузлов в среднем в три раза превосходит количество метастатических, а 75-й процентиль количества метастатических лимфоузлов (т.е. максимальное значение для 75% наблюдений) ниже 25-ого перцентиля количества удаляемых лимфоузлов (т.е. минимального значения для 75% наблюдений). Таким образом, полученные результаты оценки объема ЛАЭ указывают на ее адекватный характер в отношении обеспечения радикальности хирургического лечения. Это, на наш взгляд, является одним из важных предварительных выводов данной работы, т.к. для оценки клинического значения анализа СЛУ как маркера регионарного распространения опухоли необходимо в первую очередь удостовериться, что существующая хирургическая техника обеспечивает радикальное удаление опухоли, а ложно-отрицательные результаты биопсии СЛУ (т.е. развитие регионарных рецидивов в случае

отрицательной биопсии СЛУ) не будут следствием неадекватного хирургического лечения.

В зависимости от сочетания размера опухоли и объема метастатического распространения пациенты в исследовании были распределены в следующие группы в зависимости от стадии заболевания (таблица 15).

**Таблица 15.** Распределение пациентов в зависимости от стадии заболевания

<b>Стадия заболевания</b>	<b>Количество пациентов, чел. (%)</b>
I	45 (29,6)
IIa	51 (33,6)
IIb	23 (15,1)
IIIa	29 (19,0)
IIIb	4 (2,6)

По результатам патоморфологического исследования наиболее распространенным гистологическим типом был инфильтративный протоковый рак (58,6%), реже наблюдались инфильтративный дольковый рак (19%), смешанный тип (18,4%), микропапиллярная аденокарцинома (2,6%) и слизистая аденокарцинома (1,3%). В таблице 16 представлено количество пациентов в группах в зависимости от гистологического типа опухоли

**Таблица 16.** Распределение пациентов в зависимости от гистологического типа опухоли

<b>Гистологический тип</b>	<b>Количество пациентов, чел. (%)</b>
Смешанный тип	28 (18,4)
ИПР	89 (58,6)
ИДР	29 (19,0)
МП	4 (2,6)
Слизистый тип	2 (1,3)
ИПР - инфильтративный протоковый рак; ИДР - инфильтративный дольковый рак; МП - микропапиллярный рак	

При анализе дифференцировки наиболее часто опухоли были представлены второй степенью злокачественности (GII) - 73 из 152 человек (48%). В таблице 17 представлено количество пациентов в группах в зависимости от степени злокачественности опухоли.

**Таблица 17.** Распределение пациентов в зависимости от степени злокачественности опухоли

<b>Степень злокачественности</b>	<b>Количество пациентов, чел. (%)</b>
G1	43 (28,3)
G2	73 (48,0)
G3	36 (23,7)

При иммуногистохимическом исследовании анализировался уровень экспрессии *Ki67*, рецепторов стероидных гормонов (эстрогена, прогестерона) и *HER2/neu* (высокий уровень экспрессии последнего подтверждался флуоресцентной *in situ* гибридизацией, FISH). В таблицах 18,19,20 представлено распределение пациентов в зависимости от рецепторного статуса опухоли.

**Таблица 18.** Распределение пациентов в зависимости от уровня экспрессии *Ki67*

<b>Экспрессия <i>Ki67</i></b>	<b>Количество пациентов, чел. (%)</b>
<14%	33 (21,7)
>14%	119 (78,3)

**Таблица 19.** Распределение пациентов в зависимости от уровня экспрессии рецепторов стероидных гормонов

<b>Рецепторы стероидных гормонов</b>	<b>Количество пациентов, чел. (%)</b>
Эстроген-позитивный	112 (73,7)
Эстроген-негативный	40 (26,3)

**Таблица 20.** Распределение пациентов в зависимости от уровня экспрессии Her2/neu

Уровень экспрессии Her2/neu	Количество пациентов, чел. (%)
+1	46 (30,3)
+2	70 (46,0)
+3 (подтверждено FISH)	36 (23,7)

Таким образом, по результатам иммуногистохимической оценки 73,7% образцов были представлены опухолями с эстроген-позитивным статусом, в 21,7% случаев уровень экспрессии *Ki67* был ниже 14%, а в 23,7% наблюдений отмечалась гиперэкспрессия/амплификация *HER2/neu (erbB2)*.

Полученные результаты иммуногистохимической оценки свидетельствуют о следующем фенотипическом составе обследуемой группы (таблица 21).

**Таблица 21.** Распределение пациентов в зависимости от фенотипа опухоли

Фенотип	Количество пациентов, чел. (%)
Трижды негативный	13 (8,7)
Люминальный А	33 (21,7)
Люминальный В ( <i>HER2/neu+/-</i> )	89 (58,4)
<i>HER2/neu</i> -позитивный	17 (11,2)

Принимая во внимание все исследованные клиничко-морфологические характеристики, можно сделать вывод, что в целом по совокупности признаков обследованная совокупность пациентов или сбалансирована по ряду признаков (возраст, локализация опухоли), или отражает закономерности распределения генеральной совокупности. Еще раз следует подчеркнуть, что анализ объема лимфодиссекции продемонстрировал адекватность требованиям радикального удаления опухоли, что дает исследователю моральное право или отказаться от ЛАЭ в случае негативного результата биопсии СЛУ, или выполнять ее при наличии показаний, будучи уверенным в ее адекватности.

## 2.2. Инструментальные методы обследования

Стандартный минимальный объем предоперационного обследования включал клинический осмотр, маммографическое исследование обеих молочных желез прямой и косой проекциях, ультразвуковое исследование зон регионарного метастазирования (лимфатические узлы подмышечной, надключичной и подключичной областей) и брюшной полости, рентгенологическое исследование органов грудной клетки, а также комплекс дополнительных методов исследования (КТ, МРТ, остеосцинтиграфия и т.д.) по показаниям. Рентгенологическое исследование проводили на маммографической установке "MAMMODIAGNOST US" фирмы "Philips". Ультразвуковое исследование аппарате «SONOLINE Elegra» фирмы и «Vivid 4» фирмы GE.

Ультразвуковое исследование проводили всем 152 пациентам. Метод широко распространен, не связан с дозовой нагрузкой, многократно повторяем, не требует больших затрат и может безопасно использоваться при динамическом наблюдении.

Ультразвуковое исследование в В-режиме проводили на аппарате «SONOLINE Elegra» фирмы SIEMENS с использованием линейного мультисекторного датчика 5-13 МГц, а также на «Vivid 4» фирмы GE с использованием линейного мультисекторного датчика 7,5-10 МГц.

Ультразвуковое исследование подмышечной области осуществляли по следующей схеме для максимальной визуализации данной области. Исследование начиналось с сагиттального расположения датчика в области дна подмышечной ямки у нижнего края большой грудной мышцы. Движение осуществлялось в сторону широчайшей мышцы спины и в обратном направлении. Далее, в противоположном направлении обследовалась вся подмышечная область. У всех пациентов проводилось исследование зон вблизи нижнего края большой грудной мышцы на уровне третьего ребра (зона локализации узла Зоргиуса), центральной области подмышечной ямки (зона локализации узла Бушмакина) и область в проекции латерального края подлопаточной мышцы (подлопаточные

лимфатические узлы). Исследование по этой схеме позволяло указать точную анатомическую принадлежность аксиллярных лимфатических узлов.

Всем 152 пациенткам была выполнена лимфосцинтиграфия с использованием радиофармпрепарата (РФП)  $^{99m}\text{Tc}$ -Технефит согласно научному протоколу, утвержденному в ФГБУ РНЦРР Минздрава России «Исследование возможностей расширения сферы применения серийно производимых радиофармпрепаратов и наборов для их приготовления путем использования альтернативных путей введения в организм человека».

Методика исследования.

Приготовление радиофармпрепарата  $^{99m}\text{Tc}$ -Технефит осуществлялось согласно инструкции завода изготовителя так же, как и для внутривенного введения, однако, после этого для получения частиц нужного размера (~ 100 нм) приготовленный раствор дополнительно пропускали через специальные стерильные фильтры Millex.

Далее периареолярно в 4 точки на расстоянии 1,5-2 см от соска строго внутрикожно вводилось по 0,25 мл раствора каждого РФП активностью 0,4 мКи. После внутрикожного введения частицы РФП проникают через поры лимфатических капилляров и подвергаются фагоцитозу в лимфатических узлах, благодаря чему становится возможна их визуализация.

Через 20 минут, а также через 1,5 часа и 3 часа после введения РФП выполнялась серия статических снимков на цифровой гамма-камере NUCLINE DH-V SPIRIT (Рисунок 3).

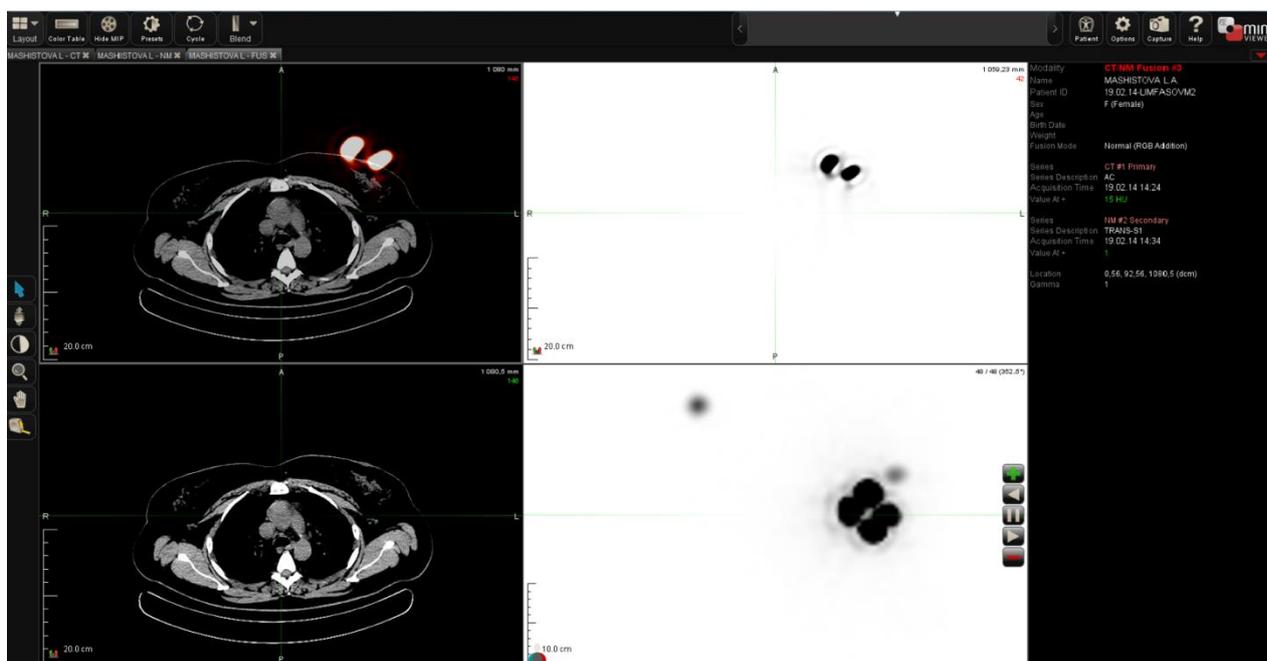
Зона интереса включала в себя место введения РФП, аксиллярные, над – и подключичные зоны с обеих сторон. При проведении планарной сцинтиграфии использовались следующие параметры записи – матрица 256x256, съемка в передней и задней проекциях до набора 700 тысяч импульсов на изображение. Визуальный анализ сцинтиграмм проводился в стандартных цветовых шкалах, оценивались количество и локализация очагов гиперфиксации РФП в проекции зон регионального лимфатического оттока.

На втором этапе проводилась однофотонная эмиссионная компьютерная томография, совмещенная с мультиспиральной компьютерной томографией (ОФЭКТ-КТ), позволяющая получать послойную картину распределения радиоиндикатора в органе, с последующей реконструкцией его трехмерного изображения. Совмещение однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ-КТ) с рентгеновской томографией давало возможность получить одновременно функциональное и анатомическое изображение исследуемой зоны (Рисунок 4).



**Рисунок 3.** Визуализация СЛУ с использованием цифровой гамма-камеры NUCLINE DH-V SPIRIT. Визуализация СЛУ с использованием ОФЭКТ-КТ

Все ОФЭКТ-КТ исследования выполнялись на комбинированной системе PHILIPS PRECEDENCE. Параметры ОФЭКТ-КТ – коллиматор средних энергий, матрица 128x128, 32 проекции по 40 секунд на каждую, параметры МСКТ – коллимация 16x0,75, питч 0,9, толщина среза не более 2 мм, напряжение рентгеновской трубки 120 кВ (взрослые), 140 кВ (взрослые с избыточной массой тела).



**Рисунок 4** По ОФЭКТ-КТ-сканам производился как анализ анатомического изображения – уровень расположения лимфатических узлов, их размер, структура и форма, так и интенсивность включения в них радиоиндикатора, наличие блока лимфатического оттока и/или сформировавшегося патологического коллатерального лимфатического оттока на исследуемом уровне.

На последнем этапе осуществлялась интраоперационная радиометрия с целью поиска СЛУ. Интраоперационный поиск сигнальных лимфатических узлов проводился с использованием портативного гамма-сканера Neo2000 («NeoProbe» США). Прибор представляет собой однодетекторный радиометр, в состав которого входят датчик-щуп и счетная камера, что позволяет производить подсчет радиоактивных импульсов на незначительном расстоянии от объекта и дифференцировать ткани с различным уровнем накопления РФП. Использование коллиматора позволило сузить исследуемое поле до 5-6 мм (рисунок 5).

Проблема при использовании портативного гамма зонда заключается в том, что даже на относительно небольших расстояниях от СЛУ не происходит детекция импульсов, или улавливается только фоновое излучение, т.е. при наличии избыточной подкожно-жировой клетчатки определить проекцию СЛУ с помощью

гамма зонда представляется весьма затруднительным, а в некоторых случаях практически невозможным. Определение проекции СЛУ с помощью планарной сцинтиграфии также затруднительно в связи с отсутствием топографических ориентиров. Как раз в таких ситуациях трудно переоценить данные ОФЭКТ-КТ.

А. Лимфоузел без РФП.



Б. Регистрация гамма-излучения в СЛУ.



**Рисунок 5.** Определение уровня гамма-излучения

Определяя топографию СЛУ по данным ОФКТ, выполняется разрез кожи над предполагаемой проекцией СЛУ. Далее по мере рассечения тканей и приближения к СЛУ датчик начинает по нарастающей определять уровень гамма-

излучения и в итоге обнаруживается СЛУ. Как видно на рисунке 5, на расстоянии около 7-8 см (расстояние между лимфоузлами) от СЛУ не определяется даже фоновое гамма-излучение при отсутствии между лимфоузлами препятствий в виде жировой клетчатки.

### 2.3. Патоморфологическое исследование

Морфологическое исследование опухоли включало следующие этапы: гистологическое исследование опухоли и блока регионарных лимфоузлов, а также иммуногистохимическое исследование экспрессии рецепторов стероидных гормонов (эстрогенов, прогестерона), эпидермального фактора роста *HER2/neu*, а также цитогенетический анализ амплификации гена *c-erbB2* методом FISH.

Патоморфологическое исследование удаленных лимфатических узлов проводилось по стандартной методике. Сторожевые лимфатические узлы исследовались с изготовлением 10 срезов толщиной 5 мкм, частотой шага микротомом 500 мкм. По результатам патоморфологического исследования операционного материала производилась оценка чувствительности и точности метода в определении состояния аксиллярных лимфатических узлов при раке молочной железы.

Для проведения иммуногистохимического исследования использовали материал, предварительно фиксированный в 10% нейтральном буферном формалине и заключенный в парафин. Срезы толщиной 3-5 мкм после депарафинирования в трех сменах ксилола по 15 минут, двух сменах этанола (100% и 96%) и регидратации нагревали для восстановления антигенных свойств при температуре 95 °С.

Время нагревания для антител к рецепторам эстрогена (N 1575 ДАКО, Дания), прогестерона (N 1630 ДАКО, Дания) составляло 20 минут или 40 минут для *c-erbB-2* (1:400, A0485 ДАКО, Дания) в растворе для восстановления антигенных свойств с pH 6,0 (S 1700, ДАКО, Дания).

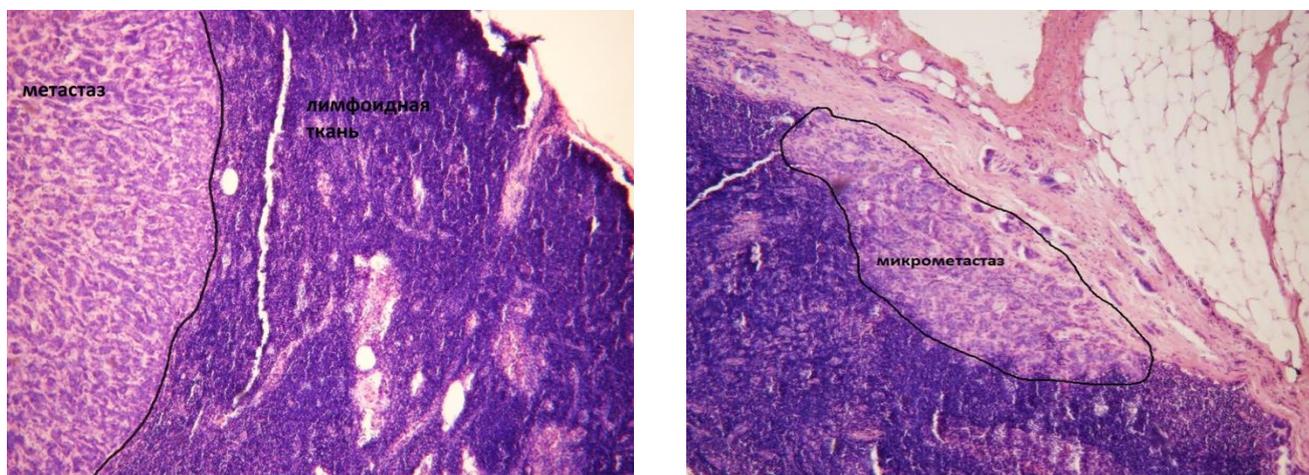
После остывания в течение 20 минут при комнатной температуре и 3 минут промывки в дистиллированной воде блокировали эндогенную пероксидазу 3% раствором перекиси водорода (S 2001, DAKO, Дания) в течение 5 минут.

После нанесения первичных антител препараты инкубировали на водяной бане в холодильнике при 4 °С в течение 12ч.

На всех этапах для промывки срезов использован стандартный раствор трис-буфера (S 3001, DAKO, Дания).

На втором этапе использовали проявочную систему DAKO REAL™ EnVision™, Rabbit/Mouse. В качестве хромогена использован диаминобензидин. Данная методика соответствует ручной проводке образцов. При окрашивании в автостейнере время инкубации с антителами соответствуют выбранным протоколам.

Доокрашивание исследуемых образцов выполняли раствором гематоксилина Mayer в модификации Lillie (S3309, DAKO, США). После дегидратации в этаноле, ксилоле срезы заключали в бальзам и просматривали в световом микроскопе.



**Рисунок 6** — Гистологическая картина лимфоузла с макрометастазом (А) и с микрометастазом (Б).

А - гистологическая картина лимфатического узла с макрометастазом. Окраска гематоксилин-эозин, х200

Б - гистологическая картина лимфоузла с микрометастазом. Окраска гематоксилин-эозин, х200

Результаты иммуногистохимических реакций оценивались полуколичественным способом. Учитывался как характер окрашивания, так и его интенсивность.

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.

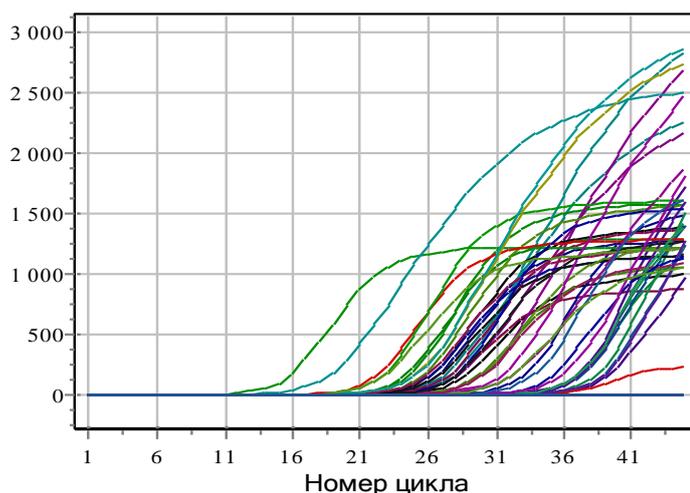
#### **а. Полимеразная цепная реакция в реальном времени (РВ-ПЦР) как основной метод исследования**

Для количественной оценки содержания мРНК в образце использовалась ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР), принципиальной особенностью которой является возможность детекции накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения амплификации. Известно, что кинетика накопления ампликонов непосредственно зависит от числа копий исследуемой матрицы и это позволяет проводить количественные измерения ДНК и РНК интересующих генов. В частности, флуорофоры для мечения нуклеотидов действуют по следующему принципу: специфическая последовательность нуклеотидного зонда, комплементарная фрагменту матричной цепи ДНК между прямым и обратным праймерами, на своем переднем и заднем отрезках содержит флуорофор и его гаситель, до определенного момента ингибирующий свечение. Схематически картина активации красителя выглядит следующим образом:

Пространственная конформация зонда, молекулы флуоресцентной метки и гасителя сконструирована таким образом, что до определенного момента квантовая активность флуорофора подавляется гасителем. На этапе гибридизации зонд комплементарно связывается с нитью матрицы ДНК, с которой одновременно транскрибируется дочерняя нить. В основе активации флуоресценции лежит 5'-3' экзонуклеазная активность полимеразы, которая при построении дочерней цепи понуклеотидно фрагментирует зонд. При этом флуорофор высвобождается из-под давления гасителя и активируется. Данные системы флуоресценции обладают

значительно большей специфичностью по сравнению с интеркалирующими красителями.

В современных системах амплификации для возбуждения флюоресценции используется излучение в соответствующей области спектра с последующей детекцией изменения длины волны. Как только сила сигнала превысит некоторый пороговый уровень шума, его изменение будет графически отображаться в формате реального времени в форме экспоненциальной кривой, поднимающейся выше уровня изолинии. Именно точка пересечения кривой с осью ОХ и является так называемым пороговым циклом, относительным значением, отражающим концентрацию транскрипта в растворе. Графически интерфейс программы РВ-ПЦР выглядит следующим образом (рисунок 7):



**Рисунок 7.** Интерфейс программы РВ-ПЦР (уровень пороговой детекции лежит на оси Х, точка пересечения экспоненты амплификации является номером цикла детекции)

С целью стандартизации методики РВ-ПЦР и для получения воспроизводимого алгоритма расчета результатов необходимо введение внешних или внутренних стандартов, относительно которых будет производиться количественная оценка реакции. Одним из возможных вариантов является одновременное определение экспрессии так называемых «референсных» генов, экспрессия которых не зависит от различных специфических условий.

В целом, после статистической обработки результатов РВ-ПЦР, исследователь получает информацию об относительном уровне экспрессии изучаемых генов.

### **i. Методика пробоподготовки и РВ-ПЦР в настоящем исследовании**

Процедура от момента получения образца ткани до получения результатов РВ-ПЦР состояла из трех этапов: выделение мРНК из образца ткани, проведение обратной транскрипции и собственно ПЦР.

На этапе выделения РНК использовались коммерческие наборы колонок 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 НПО «ДНК Технология», 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 обратной транскрипции кДНК разводили в 10 раз в ТЕ-буфере. Полученный раствор кДНК либо немедленно использовался для РВ-ПЦР, либо хранился при -20°C.

Для постановки ПЦР использовались реактивы фирмы ООО «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. Оптимальную температуру отжига праймеров и зондов подбирали экспериментально с использованием режима «градиент температур», для всех тест-систем температура была унифицирована и

составила 64°C. 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 принципам, предложенным Vad, используя несколько формул:

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

где  $C_i$  – уровень экспрессии гена без учета количества материала,

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

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

2 – эффективность амплификации.

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

$NF_{HKG1}$  – нормировочный фактор для одного нормировочного гена/HouseKeeping Gene,

$C_{p \ hkg1}$  - 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.

$$NF = \sqrt[n]{NF_{hkg1} \times NF_{hkg2} \times \dots \times NF_{hkg \ n}} \text{ (формула 3)}$$

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

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

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

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

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

где  $C_T$  – уровень экспрессии гена без учета количества материала,  
NF- нормировочный фактор с учетом всех нормировочных генов.

$$\text{Уровень экспрессии} = [C_{NF}] / [C_{NF \min}] \text{ (формула 5),}$$

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. В качестве референсного использовался ген HPRT (Гипоксантин-гуанин фосфорибозилтрансфераза).

ПЦР исследования выполнены наборами для ПЦР анализа в реальном времени фирмы ООО «ДНК Технология» (Россия) с использованием панели, позволяющей оценить уровень экспрессии следующих генов: *KRT19*, *MGB1*, *CTSL2*, *BCL2*, *MYC*, *BIRC5*, *CCND1*, *NDRG1*, *CD68*, *Ki67*, *TERT*, *Her2*, *PTEN*, *BAG1*, *PGR*, *CCNB1*, *ESR1*, *GRB7*, *MMP11*, *STK15*, *MYBL2*, *p16INK4a*, *EGFR*, *CD45*.

#### **в. Статистические методы анализа**

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 использован U-критерий Манна-Уитни, для попарного сравнения большего количества групп использовался критерий Ньюмена-Кейлса. В случае правильного распределения исследуемого признака использовались параметрические методы статистического анализа, в частности, критерий Стьюдента. Результаты представлены в виде  $M \pm StD$  (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение). Различие групп полагали статистически значимым при  $P < 0,05$ . Обработку полученных результатов проводили в программном пакете StatSoft Statistica 7.0.

В качестве сравнительных критериев бинарной оценки диагностических методов для выражения соотношения общего числа правильных положительных классификаций к общему числу положительных результатов использовались значения чувствительности и специфичности, а также сравнение площадей под ROC-кривой (receiver operating characteristic - рабочая характеристика приёмника).

## **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ДИАГНОСТИКИ МЕТАСТАЗОВ В СИГНАЛЬНЫЕ ЛИМФОУЗЛЫ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

### **3.1. Результаты визуализации СЛУ**

С целью сравнения диагностических возможностей различных методов и их удобства для рутинного клинического использования всем 152 пациентам, включенным в исследование, выполнялся поиск СЛУ (как на предоперационном этапе, так и интраоперационно) с использованием нескольких различных методик. На предоперационном этапе поиск СЛУ выполнялся с использованием обзорной сцинтиграфии в передней и переднебоковой проекции и ОФЭКТ-КТ. Интраоперационно визуализация СЛУ проводилась с использованием гамма-сканера Neo2000 («NeoProbe» США). Пациенты были сбалансированы по возрасту, индексу массы тела, размеру и локализации первичной опухоли.

#### **3.1.1. Определение сигнального лимфоузла с использованием планарной сцинтиграфии и ОФЭКТ-КТ**

Всем пациенткам была выполнена лимфосцинтиграфия по указанной выше методике.

На планарных статических сцинтиграммах в передней, задней и боковой проекциях, выполненных через 20 минут после внутрикожного введения РФП, у всех пациенток определялось накопление радиометки в месте инъекции. У 126 (83%) женщин визуализировалось накопление радиоиндикатора также в аксиллярных лимфатических узлах на стороне пораженной молочной железы в виде одного или нескольких очагов гиперфиксации.

У 26 женщин (17%) на сцинтиграммах, выполненных через 20 минут после внутрикожной инъекции, накопления РФП в проекции регионарных лимфатических узлов не определялось. При выполнении дополнительных планарных снимков через 1,5 и через 3 часа после инъекции у данной группы женщин нам также не удалось получить визуализацию достоверного накопления радиометки в проекции зон регионарного метастазирования. Однако, при

выполнении ОФЭКТ-КТ у 25 женщин из 26 были выявлены СЛУ. Скорее всего это связано с небольшими размерами СЛУ, или экранированием гамма-излучения избыточной подкожно-жировой клетчаткой.

Мы провели сравнительный анализ визуализации сторожевых лимфатических узлов на планарных сцинтиграммах в зависимости от возраста пациенток, индекса массы тела, локализации опухоли, ее размеров, результатов гистологического и иммуногистохимического исследований.

Возраст пациенток в группе с отсутствием визуализации сторожевых лимфатических узлов на планарных сцинтиграммах колебался от 41 года до 65 лет, средний возраст составлял 54,8 года.

У большинства пациенток (17 человек, 67%) опухоль локализовалась в правой молочной железе, при этом в 46% случаев в верхне-наружном квадранте, в 31% - в центральном секторе, в остальных случаях в равных % соотношениях (по 11,5%) опухолевый узел локализовался в нижне-наружном квадранте либо в верхне-внутреннем квадранте молочной железы.

В 12 случаях (46%) размер опухоли не превышал 2 см, у 14 (54%) женщин размер опухолевого узла колебался от 2,2 см до 4,5 см.

По результатам гистологического исследования у 20 женщин был выявлен инфильтративный протоковый рак, причем в 90% случаев 2 степени злокачественности, в 10% случаев - 3 степени злокачественности. У 6 пациенток определялся инфильтративный дольковый рак 2 степени злокачественности.

При иммуногистохимическом исследовании оказалось, что частота встречаемости люминальных типов А и В, а также тройного негативного рака была примерно одинаковой. Так, в 30,8% наблюдений (8 человек) речь шла о тройном негативном варианте, когда отсутствовала реакция к рецепторам эстрогена и прогестерона, а также к онкобелку *herb-B2*, на люминальные типы А и В приходилось по 34,6% соответственно.

Ретроспективный анализ послеоперационного патоморфологического исследования лимфатических узлов показал, что метастазы в регионарные

лимфатические узлы были выявлены у 3 женщин (11,5%), в остальных случаях метастазы не определялись.

Анализ индекса массы тела (ИМТ) пациенток с неопределяемыми регионарными лимфатическими узлами на планарных сцинтиграммах показал, что 6 (23%) женщин имели нормальный вес, их индекс массы тела не превышал 24,9; у 8 (31%) пациенток определялся избыточный вес, когда  $25 \leq \text{ИМТ} < 30$ , в 12 случаях (46%) показатель  $\text{ИМТ} \geq 30$ , что соответствует ожирению I степени.

Подобный анализ был проведен также в группе пациенток с визуализируемыми регионарными лимфатическими узлами на планарных сцинтиграммах.

Возраст пациенток в данной группе колебался от 25 до 80 лет, средний возраст составлял 52,6 лет.

В отличие от женщин I группы, у пациенток в группе с определяемыми на планарных сцинтиграммах лимфатическими узлами, опухоль чаще всего локализовалась в левой молочной железе - 64 женщины (51%). Локализация опухолевого узла в верхне-наружном квадранте определялась в 75 наблюдениях (59,5%), в нижне-наружном квадранте - в 28 (22,3%) наблюдениях, в верхне-внутреннем - в 12 наблюдениях (9,5%), в нижне-внутреннем - в 9 наблюдениях (7,1%), в центральном секторе в 2 случаях (1,6%).

Размер опухолевого узла составлял 0,5 см - 2 см у 53 женщин (42,1%), 2,1 см - 5 см - у 66 женщин (52,3%), опухолевый узел размером более 5 см был выявлен у 7 женщин (5,6%).

Анализ результатов гистологического исследования показал, что инфильтративный протоковый рак был диагностирован в 54,8% случаев (69 женщин), инфильтративный дольковый рак в 18,2% случаев (23 женщины), микропапиллярный в 3,2% случаев (4 женщины), смешанный тип в 22,3% случаев (28 женщин), слизистый тип - в 1,5% случаев (2 женщины).

По данным иммуногистохимического исследования трижды негативный молекулярный вариант рака определялся у 5 женщин (4%), люминальный тип А у

24 (19%) женщин, люминальный тип В у 80 (63,5%) пациенток, *HER2/neu*-позитивный тип у 17 пациенток (13,5%).

Метастазы в регионарные лимфатические узлы по данным патоморфологического исследования были выявлены у половины пациенток с визуализируемыми регионарными лимфатическими узлами на планарных сцинтиграммах.

При расчете индекса массы тела у пациенток данной группы оказалось, что в 65 случаях (51,6%) вес пациенток был нормальным -  $18 \leq \text{ИМТ} \leq 24,9$ ; 39 (30,9%) женщин имели избыточный вес -  $25 \leq \text{ИМТ} \leq 29,9$ ; 20 пациенток (15,9%) страдали ожирением I степени -  $30 \leq \text{ИМТ} \leq 34,9$ ; 2 пациентки (1,6%) - ожирением II степени -  $35 \leq \text{ИМТ} \leq 39,9$ .

Сравнительный анализ показателей возраста, локализации и размера опухоли, индекса массы тела, результатов гистологического и иммуногистохимического исследований у пациенток с визуализацией регионарных лимфатических узлов на планарных сцинтиграммах либо с ее отсутствием приведен в таблице 22.

Таким образом, анализ представленных данных показал тенденцию к более высокому ИМТ в группе пациентов, у которых при планарной сцинтиграфии СЛУ не определялись - 32,2 (30,1-34,1), по сравнению с 29,3 (28,1-32) в группе, где определялись СЛУ. Возможно, еще одной причиной отсутствия визуализации СЛУ явились малые размеры СЛУ по отношению к толщине подкожно жировой клетчатки. Влияние других клиничко-морфологических признаков не выявил критериев, оказывающих существенное влияние на наличие либо отсутствие визуализации регионарных лимфатических узлов на планарных сцинтиграммах у пациенток двух групп.

После выполнения ОФЭКТ-КТ без внутривенного контрастирования у 151 женщин из 152 отмечено накопление радиоиндикатора в лимфатических узлах. При этом на планарных сцинтиграммах у 96 пациенток (77,8%) выявлялся лишь единичный очаг накопления радиоиндикатора в аксиллярной зоне, что не

позволяло однозначно высказаться о количестве лимфатических узлов, накопивших радиофармпрепарат.

**Таблица 22.** Клинико-формологическая характеристика пациентов с определяемыми (II группа) или отсутствующими (I группа) регионарными лимфатическими узлами на планарных сцинтиграммах

Описываемый параметр	I группа	II группа
	Кол-во пациенток (%)	Кол-во пациенток (%)
Количество, человек	26 (17,1%)	126 (82,9%)
Средний возраст, лет	54,8	52,6
Локализация опухоли:		
Правая молочная железа	17 (67%)	62 (49%)
Левая молочная железа	9 (33%)	64 (51%)
Верхне-наружный квадрант	12 (46%)	75 (59,5%)
Верхне-внутренний квадрант	3 (11,5%)	12 (9,5%)
Нижне-наружный квадрант	3 (11,5%)	28 (22,3%)
Нижне-внутренний квадрант	-	9 (7,1%)
Центральный сектор	8 (31%)	2 (1,6%)
Размер опухоли:		
T1 (0,5-2,0 см)	12 (46%)	53 (42,1%)
T2 (2,1-5,0 см)	14 (54%)	66 (52,3%)
T3 (более 5 см)	-	7 (5,6%)
Метастазы в регионарные лимфатические узлы:		
есть	3 (11,5%)	63 (50%)
нет	23 (88,5%)	63 (50%)

Гистологическое исследование:		
Инфильтративный протоковый рак	20 (77%)	69 (54,8%)
Инфильтративный дольковый рак	6 (23%)	23 (18,2%)
Микропапиллярный тип	-	4 (3,2%)
Смешанный тип	-	28 (22,3%)
Слизистый тип	-	2 (1,5%)
Молекулярный тип рака:		
Люминальный тип А	9 (34,6%)	24 (19%)
Люминальный тип В	9 (34,6%)	80 (63,5%)
Тройной негативный	8 (30,4%)	5 (4%)
HER2/нео позитивный	-	17 (13,5%)
Индекс массы тела:		
Нормальный вес	6 (23%)	65 (51,6%)
Избыточный вес	8 (31%)	39 (30,9%)
Ожирение I степени	12 (46%)	20 (15,9%)
Ожирение II степени	-	2 (1,6%)

Послойный анализ гибридных изображений в аксиальной, фронтальной и сагиттальной проекциях дал возможность визуализации всех регионарных лимфатических узлов, накопивших РФП, а также позволил установить их точную локализацию, размеры и структуру.

У 125 пациенток (82%) отмечалось накопление радиометки в аксиллярных лимфатических узлах медиальной группы, в остальных случаях помимо этого отмечалось накопление радиоиндикатора в аксиллярных лимфатических узлах центральной группы. При сравнительном анализе локализации опухолевого узла и накоплении радиоиндикатора в группах аксиллярных лимфатических узлов были

получены следующие данные. Так, у женщин с накоплением РФП только в медиальной группе аксиллярных лимфатических узлов опухолевый узел в 62,4% случаев (78 человек) локализовался в верхне-наружном квадранте молочной железы, в 20,8% (26 человек) - в нижне-наружном квадранте, в 4,8% (6 человек)- в верхне-внутреннем квадранте, в 4,8% (6 человек)- в нижне-внутреннем квадранте, в 7,2% (9 человек) - в центральном секторе. У женщин с накоплением РФП как в медиальной, так и в центральной группе аксиллярных лимфатических узлов (27 пациентки – 18,0%) опухолевый узел локализовался в 33,3% случаев (9 человек) в верхне-наружном квадранте молочной железы, в 18,5% (5 человек) - в нижне-наружном квадранте, в 22,2% (6 человек)- в верхне-внутреннем квадранте, в 22,2% (6 человек)- в нижне-внутреннем квадранте, в 3,7% (1 человек) - в центральном секторе. Таким образом, вопреки существующему мнению, что чаще всего СЛУ для опухолей медиальной локализации являются парастернальные или внутригрудные лимфоузлы, не было выявлено взаимосвязи расположения опухолевого узла с визуализацией определенной группы лимфатических узлов.

Фиксации РФП в проекции парастернальных, либо подключичных лимфатических узлов не было выявлено ни у одной пациентки, равно как и блока лимфатического оттока, либо признаков патологического коллатерального лимфатического оттока на исследуемом уровне. Во всех случаях лимфатические узлы имели четкие и ровные контуры, сохраняли свою зональную дифференцировку.

Ниже представлены клинические примеры с описанием методики проведения исследования

***Клинический пример № 1. Пациентка В. 54 лет.***

***Жалобы на наличие уплотнения в левой молочной железе.***

***Анамнез.*** Узел в левой молочной железе самостоятельно обнаружила 1 месяц назад.

***Клинический осмотр.*** В левой молочной железе на границе верхних квадрантов пальпируется узел размерами до 2,5 см в диаметре, плотный.

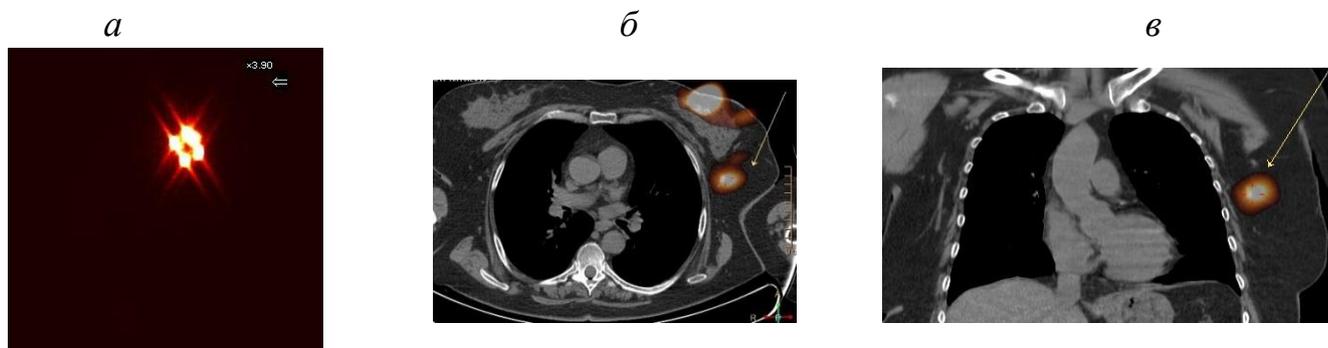
**Рост** 165 см. **Вес** 90 кг. **Индекс массы тела** 35,16.

**Маммография** - картина нерезко выраженной фиброзной мастопатии, на этом фоне на границе верхних квадрантов определяется опухолевый узел размерами 20x15 мм с тяжистыми очертаниями, неоднородной структуры.

Выполнена прицельная аспирационная биопсия опухолевого узла левой молочной железы под контролем УЗИ.

**Гистологическое заключение** - Инфильтративный протоковый рак молочной железы, 2 степени злокачественности.

**При иммуногистохимическом исследовании** реакция с антителами к рецепторам эстрогена положительна в 67% ядер опухолевых клеток (умеренное окрашивание) (7 баллов (TS) Allred score), реакция с антителами к рецепторам прогестерона положительна в 3% ядер опухолевых клеток (интенсивное окрашивание) (5 баллов (TS) Allred score), реакция с антителами к онкобелку *cerb-B2* 1+; реакция с антителами к Ki-67 положительна в 76% ядер опухолевых клеток.



**Рисунок 8.** Результаты лимфосцинтиграфии сторожевого лимфатического узла совмещенной с ОФЭКТ-КТ, при отсутствии его изображения при планарном исследовании.

**а** - планарная сцинтиграфия: визуализируется накопление РФП только в месте инъекции;

**б, в** - аксиальные и фронтальные срезы гибридного изображения: отмечается накопление РФП в месте инъекции, также слева визуализируется аксиллярный лимфатический узел, интенсивно накапливающий радиометку.

**Выполнена лимфосцинтиграфия** - при анализе планарных снимков визуализируется накопление РФП только в месте инъекции, в проекции регионарных лимфатических узлов накопления РФП нет. При выполнении ОФЭКТ-КТ грудной клетки - слева в аксиллярной области визуализируется лимфатический узел, интенсивно накапливающий радиоиндикатор ( рисунок № 8). В данном случае на планарных сцинтиграммах не удалось визуализировать сторожевые лимфатические узлы, в то время как выполнение ОФЭКТ-КТ позволило получить их отчетливое изображение.

**Клинический пример № 2. Пациентка П. 47 лет.**

**Жалобы** на наличие уплотнения в левой молочной железе.

**Анамнез.** Уплотнение заметила самостоятельно около 3 месяцев назад. Обратилась для дообследования и лечения.

**Клинический осмотр.** При пальпации слева в верхне-внутреннем квадранте определяется участок уплотнения до 2,2 см с нечеткими контурами.

**Рост** 165 см. **Вес** 85 кг. Индекс массы тела 31,22.

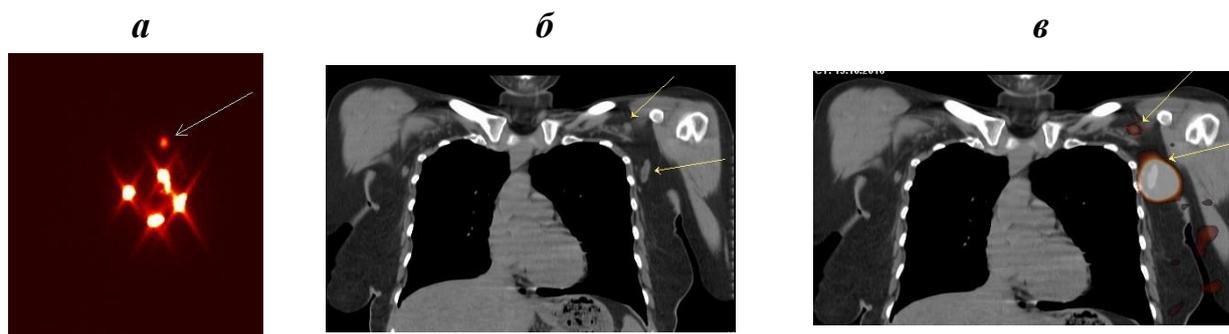
**Маммография** - слева в верхне-внутреннем квадранте определяется тень узлового образования с нечеткими, неровными контурами, размерами 20x18 мм. Выполнена биопсия образования левой молочной железы.

**Гистологическое заключение** - инфильтративный протоковый рак молочной железы, 2 степени злокачественности.

**При иммуногистохимическом исследовании** реакция с антителами к рецепторам эстрогена положительна в 93% ядер опухолевых клеток (интенсивное окрашивание) (8 баллов (TS) Allred score), реакция с антителами к рецепторам прогестерона положительна в 90% ядер опухолевых клеток (интенсивное окрашивание) (6 баллов (TS) Allred score), реакция с антителами к онкобелку *ceb-B2* 0; реакция с антителами к Ki-67 положительна в 22% ядер опухолевых клеток.

**Выполнена лимфосцинтиграфия** - при анализе планарных снимков визуализируется накопление РФП в месте инъекции, а также в проекции

аксиллярных лимфатических узлов слева. При выполнении ОФЭКТ-КТ грудной клетки - на аксиальных и фронтальных срезах отмечается накопление радиоиндикатора в аксиллярном лимфатическом узле слева. Помимо этого, визуализируется подключичный лимфатический узел, также накапливающий РФП, однако менее интенсивно, чем аксиллярный (рисунок № 9). В данном случае выполнение ОФЭКТ-КТ позволило визуализировать как сторожевой лимфатический узел, так и лимфатический узел второго порядка.



**Рисунок 9.** Лимфосцинтиграфия сторожевого лимфатического узла, совмещенная с ОФЭКТ-КТ

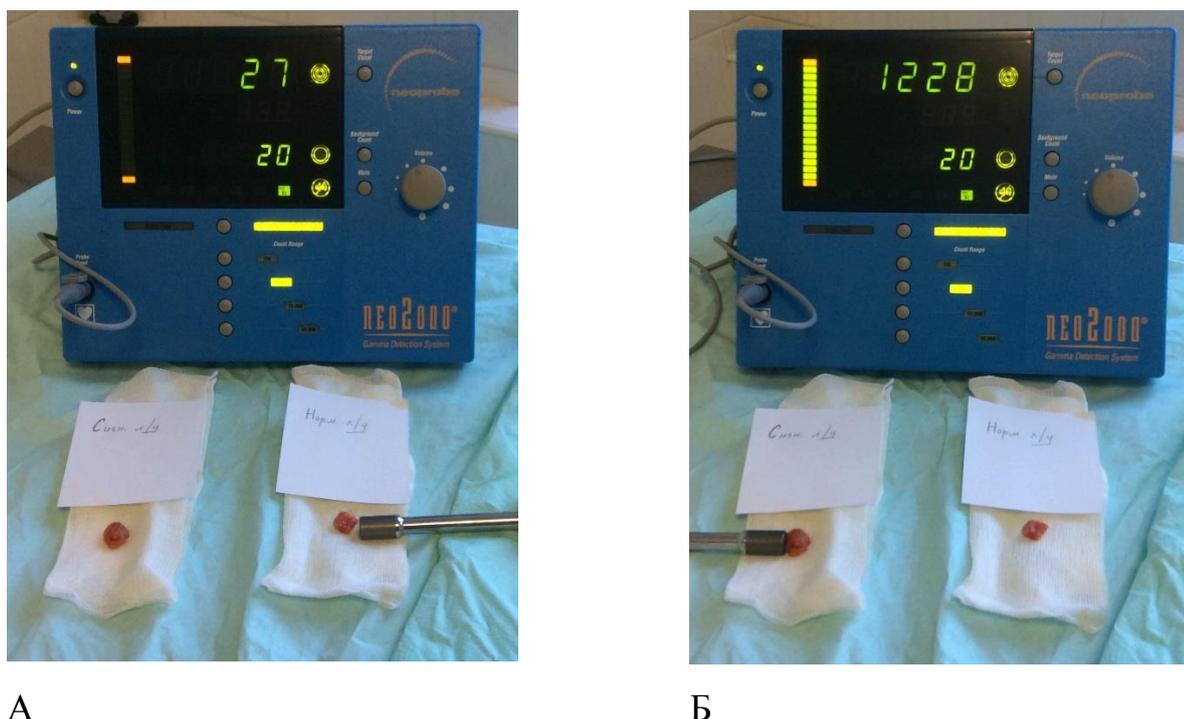
**а** - планарная сцинтиграфия: визуализируется накопление РФП в месте инъекции и в проекции аксиллярных лимфатических узлов;

**б, в** - фронтальные срезы нативной КТ и гибридного изображения: слева визуализируются аксиллярный и подключичный лимфатические узлы, накапливающие радиометку.

Таким образом, стандартная планарная лимфосцинтиграфия позволила определить сторожевые лимфатические узлы у 83% пациентов. При этом не удалось однозначно высказаться о количестве узлов, накопивших РФП, их топографии. Дополнительное выполнение ОФЭКТ-КТ позволило четко визуализировать сторожевые лимфатические узлы у 151 пациентки, определить их количество, точную локализацию, структуру и размеры, а также оценить наличие патологического перетока либо блока лимфатического оттока на исследуемом уровне.

### 3.1.2. Определение сигнального лимфоузла с использованием гамма-сканера

Для визуализации и интраоперационного поиска СЛУ использовался гамма-сканер. Исследование было проведено всем 152 пациентам. После введения РФП интраоперационно проводилось определение активности его накопления в регионарных СЛУ. На рисунке 10 представлена детекция накопления РФП в СЛУ.



А

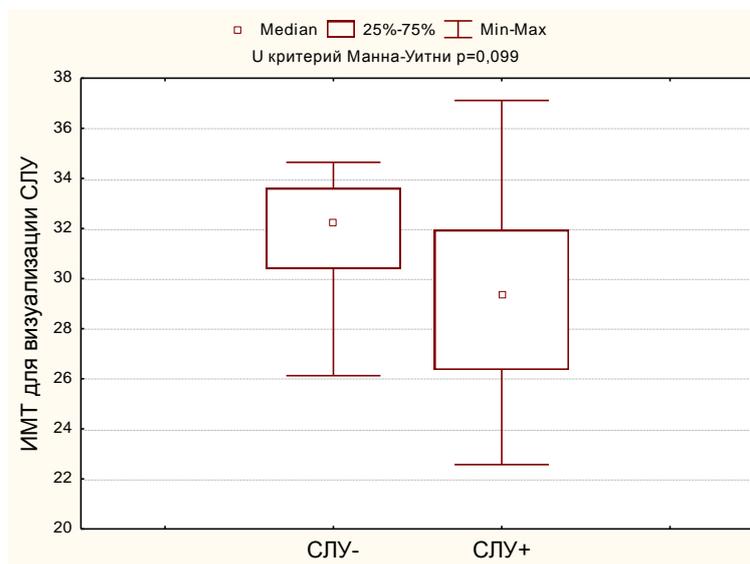
Б

**Рисунок 10.** Регистрация накопления РФП в лимфоузле с использованием гамма-сканера (А - нет накопления; Б - есть накопление)

Интраоперационно накопление РФП в "сигнальном" лимфоузле было обнаружено у 133 из 152 пациентов (87,5%).

При анализе результатов определения СЛУ с использованием гамма-сканера, также, как и при планарной сцинтиграфии (хотя и в меньшей степени), было отмечено влияние индекса массы тела на результаты исследования (рисунок 11). Рисунок демонстрирует, что среднее значение ИМТ для пациентов с

отрицательными результатами определения СЛУ (32,1; 30,1-33,8) было большим по сравнению с группой сравнения (29,5; 26,1-32).



**Рисунок 11.** Результаты визуализации СЛУ с использованием гамма-зонда в зависимости от ИМТ

Другим наблюдением, характерным для "СЛУ-негативных" по данным гамма-зонда пациентов стала локализация опухоли. В 78,9% наблюдений (15 из 19 пациентов) первичная опухоль локализовалась во внутренних квадрантах молочной железы.

Влияние других клинико-морфологических признаков на результаты исследования оказалось статистически незначимым ( $p > 0,05$ ). Таким образом, чувствительность гамма-сканера составила 87,5%. Отмечена тенденция к более высокому ИМТ в группе пациентов с отрицательным результатом, в меньшей степени на результаты повлияла локализация первичной опухоли.

Максимальную чувствительность и специфичность в исследовании продемонстрировало ОФЭКТ-КТ (чувствительность – 99,34%). Кроме того, метод позволяет четко визуализировать сторожевые лимфатические узлы у всех пациенток, определить их количество, точную локализацию, структуру и размеры, а также оценить наличие патологического перетока либо блока лимфатического оттока на исследуемом уровне. Анализ данных скинтиграфического исследования

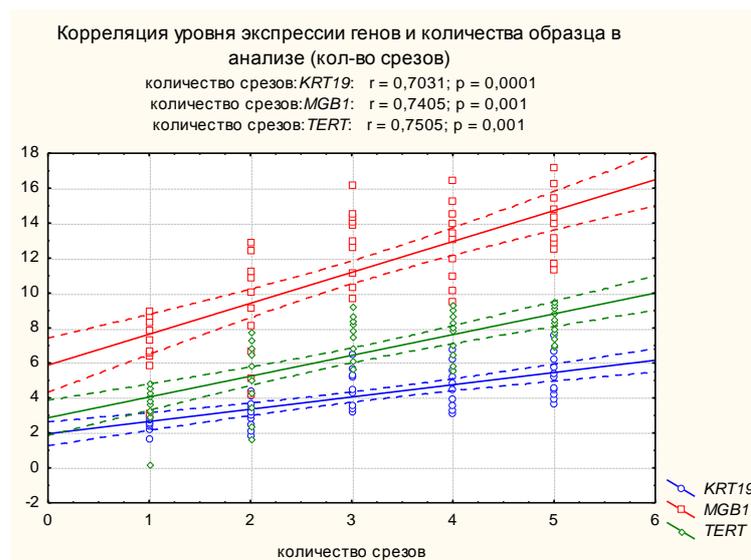
не выявил критериев, оказывающих существенное влияние на наличие либо отсутствие визуализации регионарных лимфатических узлов на планарных сцинтиграммах. Чувствительность метода составила 83%. Чувствительность использования гамма-сканера для интраоперационного поиска СЛУ составляла 87,5%. Факторами, влияющими на результативность исследования, были индекс массы тела, а в меньшей степени, малые размеры СЛУ, тотальное поражение лимфоузла и локализация первичной опухоли.

### **3.2. Анализ уровня экспрессии маркеров опухоли в определении метастазов в сигнальном лимфатическом узле**

#### **3.2.1. Сравнительный анализ уровня экспрессии генов в зависимости от количества материала, взятого в исследование**

Для оценки чувствительности и специфичности метода, основанного на определении среднего уровня экспрессии генов в лимфоузлах, в отношении микрометастазов и единичных опухолевых клеток крайне важно понять, насколько количество опухолевых клеток, попавших в анализ, влияет на результат. С этой целью мы исследовали изменение значений экспрессии генов в зависимости от количества срезов ткани лимфоузла с метастазом, взятым в анализ (один срез толщиной 10 мкм содержал метастаз площадью около 9 мм<sup>2</sup>). В исследование было взято от 1 до пяти срезов. Диаграмма рассеяния (рисунок 12) демонстрирует положительную корреляцию между уровнем экспрессии гена и количеством материала, взятого в исследование (значение коэффициента корреляции для всех генов превышает 0,7).

Таким образом, метод демонстрирует устойчивую динамику и чувствительность в отношении взятого в анализ материала от небольшого объема ткани. Однако не исключено, что объем материала может быть не единственным фактором, влияющим на уровень экспрессии гена. Не исключено, что уровень экспрессии также может зависеть от молекулярно-биологических особенностей метастаза или самой опухоли.



**Рисунок 12.** Зависимость уровня экспрессии генов от количества материала, взятого в анализ

Одной из возможных причин появления низких значений может быть низкий уровень экспрессии исследуемых маркеров в самой ткани метастаза, что, безусловно, отразится на количестве ткани, необходимой для анализа: чем ниже уровень экспрессии гена в ткани, тем большее количество ткани потребуется для достижения достаточного дифференциально-диагностического уровня экспрессии, что принципиально важно в случае определения микрометастазов и единичных опухолевых клеток в ткани лимфоузла.

### **3.2.2. Сравнительный анализ уровней экспрессии генов в ткани метастатического и интактного лимфоузла**

Ранее в ряде работ (17) отмечено, что наиболее информативным показателем для выявления метастазов рака в лимфатические узлы являются цитокератины 20, 19, 5. При этом эти же авторы указывали, что по соотношению чувствительность/специфичность наиболее точным является показатель уровня экспрессии цитокератина 19. Уточнению этого вопроса было посвящено большое количество работ, однако по-прежнему не все исследователи однозначно сходятся во мнении, что именно этот показатель оптимален для обнаружения метастазов рака в ткани лимфоузла.

Мы исследовали уровни экспрессии трех цитокератинов 20, 19, 5 в ткани опухоли и ткани метастатических и неметастатических лимфоузлов. Всего было исследовано 130 образцов ткани опухоли. Прежде всего мы обратили внимание, что для теста, определяющего цитокератин 5, было много образцов с нулевыми уровнями экспрессии (61 из 130 образцов опухоли). Лучшие результаты были в случае цитокератина 20 (17 из 130). В тоже время тест, определяющий уровень экспрессии цитокератина 19 (KRT-19), практически не имел нулевых значений. Эти результаты по анализу экспрессии трех генов цитокератинов, т.е. тканеспецифических маркеров, позволили сделать нам вывод, что наиболее перспективным тестом определения метастазов рака молочной железы в лимфатические узлы является уровень мРНК гена цитокератина 19.

Далее мы исследовали чувствительность и специфичность при определении метастазов рака в лимфатические узлы при использовании только маркера – «уровень экспрессии мРНК гена цитокератина 19». Результаты анализа уровня экспрессии цитокератина в метастатических и неметастатических лимфоузлах представлены в таблице 23. Всего проанализировано 40 неметастатических и 90 метастатических лимфоузлов.

**Таблица 23.** Уровень экспрессии мРНК цитокератина 19 в метастатических и неметастатических лимфоузлах. T-tests Стьюдента.

Ген	Количество Уровень экспрессии в Л/У N0	Уровень экспрессии Уровень экспрессии в Л/У N+	P	Кол-во образцов в Л/У N0	Кол-во образцов в Л/У N+
	ЛУ без метастазов	ЛУ с метастазами		ЛУ без метастазов	ЛУ с метастазами
<i>KRT19</i>	0,8	622,1	0,0003	40	90

Как видно из приведенных в таблице 23 результатов, отличия уровня экспрессии высоко достоверны, однако анализ количества образцов с «0» уровнем экспрессии показывает, что условно «ложно-отрицательные» значения наблюдались для 4 образцов лимфоузлов, в которых морфологически были

обнаружены метастазы. В таблице 24 приведены результаты дискриминантного анализа классификации метастатических и неметастатических лимфоузлов только на основании уровня экспрессии мРНК *KRT19*

**Таблица 24.** Дискриминантный анализ метастатических и неметастатических лимфоузлов на основании уровня экспрессии мРНК цитокератина 19

Группа	Правильная классификация, %	ЛУ с низким уровнем экспрессии	ЛУ с высоким уровнем экспрессии
Без метастазов	100	40	0
С метастазами	95,6	4	86
Всего	96,9	44	86

Приведенные данные показывают, что уровень экспрессии цитокератина 19 может быть эффективным маркером наличия метастазов рака в лимфоузлах. При этом, предиктивная значимость отрицательного ответа составляет 100%. Т.е. отсутствие метастазов в 100% случаев определяется низким уровнем экспрессии или ее отсутствием (т. е. специфичность теста составляет 100%). В тоже время, достоверность положительного ответа составляет 95,55%, т. е. в 4,45% случаев уровень экспрессии цитокератина 19 также остается низким при наличии метастазов в лимфоузле. Очевидно, что это связано с тем, что в нескольких случаях в метастатических лимфоузлах уровень экспрессии не определялся. В имеющихся публикациях, посвященных вопросу обнаружения метастазов рака в лимфоузлы, для повышения чувствительности использовали комбинацию различных цитокератинов. Однако наши результаты показывают, что изученные нами цитокератины *KRT20* и *KRT5*, также имели нулевой уровень экспрессии мРНК в некоторых образцах опухоли. Поэтому мы решили исследовать уровень экспрессии генов в тканях лимфоузлов, используемых в тестах для анализа фенотипов рака молочной железы, с точки зрения возможности применения их для оптимизации диагностической панели для определения метастатических лимфоузлов. Гены, включаемые в такие панели, имеют не только тканеспецифические характеристики (например, *HER2/neu*, *ESR1*, *PGR*), но и коррелируют с пролиферативной

активностью (циклины *D*, *B*, *MYC*) и характеристиками, отражающими межклеточные взаимодействия (тканевые металлопротеазы и др.). Уровень экспрессии этих генов в лимфоузлах ранее не изучался. Всего было исследовано 40 неметастатических и 90 метастатических лимфоузлов.

**Таблица 25** — Сравнение средних уровней экспрессии комплекса генов в метастатических (ГР2) и не метастатических (ГР1) лимфоузлах.

Ген	Среднее ГР1	Среднее ГР2	p
<i>MGB1</i>	214340,0	626236,2	0,11
<i>CTSL2</i>	14,4	68,0	0,01
<i>BCL2</i>	200,3	113,4	0,03
<i>MYC</i>	37,5	53,8	0,59
<i>BIRC5</i>	15,6	48,3	0,00
<i>CCND1</i>	4,5	40,9	0,00
<i>NDRG1</i>	2332,1	778,7	0,14
<i>CD68</i>	13,4	8,8	0,00
<i>KI67</i>	58,7	192,8	0,00
<i>TERT</i>	57,0	36,8	0,31
<i>HER2</i>	19,7	429,0	0,01
<i>PTEN</i>	1423,6	1356,7	0,72
<i>BAG1</i>	2,9	10,8	0,05
<i>PGR</i>	3221,9	10041,3	0,14
<i>CCNB1</i>	5,4	38,5	0,05
<i>ESR1</i>	391,2	1149,1	0,17
<i>GRB7</i>	91,5	9861,5	0,00
<i>MMP11</i>	141,4	2148,6	0,05
<i>STK15</i>	4,8	37,6	0,01
<i>MYBL2</i>	19,4	8,6	0,00
<i>P16INK4A</i>	29,4	69,6	0,01
<i>EGFR</i>	93,1	54,7	0,04
<i>KRT-19</i>	0,8	622,1	0,00
<i>CD-45</i>	382,3	270,5	0,28

Сравнение средних уровней экспрессии (таблица 25) и логарифма средних уровней экспрессии (таблица 26) показывают, что наравне с цитокератином 19 (*KRT19*) уровень экспрессии большого количества генов имеет достоверные отличия в метастатических и неметастатических лимфоузлах.

**Таблица 26** — Сравнение средних логарифмов уровней экспрессии комплекса генов в метастатических (ГР2) и не метастатических (ГР1) лимфоузлах.

<b>ГЕН</b>	<b>Среднее ГР1</b>	<b>Среднее ГР2</b>	<b>p</b>
<i>MGB1_ln</i>	4,344691	9,766959	0,000000
<i>CTSL2_ln</i>	2,499181	3,811061	0,000000
<i>BCL2_ln</i>	4,850297	3,970246	0,001183
<i>MYC_ln</i>	3,453028	2,736151	0,001013
<i>BIRC5_ln</i>	2,747993	3,873670	0,000000
<i>CCND1_ln</i>	1,226582	2,960652	0,000000
<i>NDRG1_ln</i>	8,655194	7,345321	0,047990
<i>CD68_ln</i>	2,511792	1,996278	0,000051
<i>Ki67_ln</i>	3,846967	5,063365	0,000000
<i>TERT_ln</i>	3,975694	3,523484	0,119399
<i>Her2_ln</i>	2,244930	4,697732	0,000000
<i>PTEN_ln</i>	6,814731	6,966982	0,463531
<i>BAG1_ln</i>	0,844773	1,541871	0,000324
<i>PGR_ln</i>	6,112692	7,826877	0,000073
<i>CCNB1_ln</i>	1,505285	2,618551	0,000000
<i>ESR1_ln</i>	3,124939	5,516150	0,000000
<i>GRB7_ln</i>	3,014548	7,654381	0,000000
<i>MMP11_ln</i>	3,295626	5,743306	0,000000
<i>STK15_ln</i>	1,410880	3,053791	0,000000
<i>MYBL2_ln</i>	2,922862	1,971683	0,000000
<i>p16INK4a_ln</i>	3,099523	3,753791	0,000483
<i>EGFR_ln</i>	4,488579	3,631529	0,000292
<i>KRT19_ln</i>	0,092708	5,352101	0,000000
<i>CD45_ln</i>	5,974068	5,167107	0,010504

Если говорить о логарифмах уровня экспрессии, а именно это сравнение при применении параметрического теста Стьюдента особенно интересно, то можно сделать важное наблюдение, что кроме двух генов (*TERT*-гена теломеразы и гена *PTEN*) уровень экспрессии остальных генов достоверно отличаются. Это позволяет провести анализ возможности увеличения дифференциальной диагностики наличия или отсутствия метастазов в лимфоузлы с включением одного или группы этих генов в диагностическую панель.

С этой точки зрения интерес представляет ген маммаглобина, т. к. он часто используется как тканеспецифический маркер РМЖ. Если добавить в диагностическую панель дополнительно к цитокератину 19 маркер маммаглобин, то диагностическая информативность такой панели увеличится с 96% (только для одного цитокератина 19) до почти 98% - для комбинации маммаглобин - цитокератин 19 (таблица 27).

**Таблица 27.** Дискриминантный анализ метастатических и неметастатических лимфоузлов на основании уровня экспрессии двух маркеров: маммаглобина и цитокератина 19

Группа	Правильная классификация, %	ЛУ с низким уровнем экспрессии	ЛУ с высоким уровнем экспрессии
Без метастазов	100	32	0
С метастазами	97,3	2	71
Всего	97,9	34	71

Интересно также отметить, что уровень экспрессии маммаглобина обнаружен во всех исследованных неметастатических лимфоузлах, за исключением 2, хотя он и экспрессируется на достоверно меньшем уровне по сравнению с уровнем в метастатических лимфоузлах.

Добавление в диагностическую панель другого тканеспецифического маркера -*HER2/neu* (его уровень экспрессии также достоверно отличается в

группах лимфоузлов с и без метастазов) не изменяет диагностической информативности панели.

Для определения наличия метастазов в лимфоузлы мы также попробовали включить в диагностический набор и комплекс генов используемых для фенотипирования рака молочной железы при иммуногистохимическом исследовании.

Результаты дискриминантного анализа при включении в диагностический набор *HER2/neu*, *ESR1*, *PGR* приведены в таблице 28.

**Таблица 28.** Дискриминантный анализ метастатических и неметастатических лимфоузлов на основании уровня экспрессии маркеров: *Ki67*, *HER2/neu*, *ESR1*, *PGR*

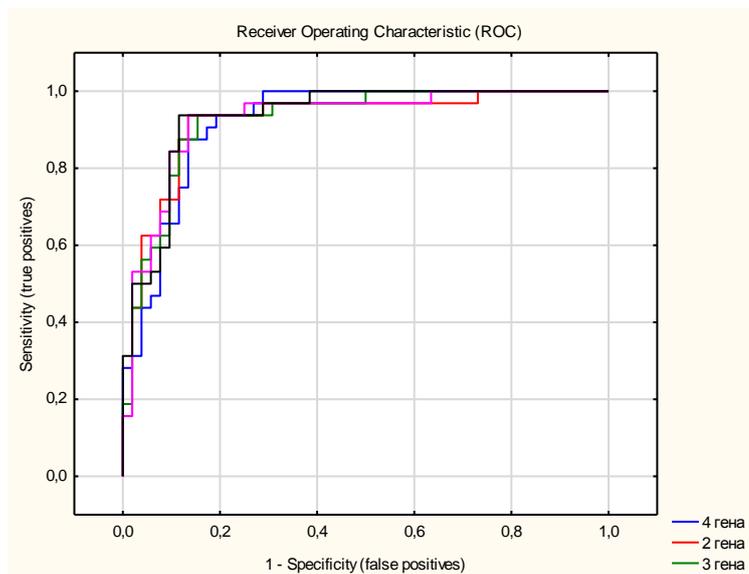
Группа	Правильная классификация, %	ЛУ с низким уровнем экспрессии Л/У N0	ЛУ с высоким уровнем экспрессии Л/У N+
ЛУ N0.	87,5	35	5
ЛУ N+.	88,5	9	69
Всего	88,1	44	74

Приведенные в таблице результаты показывают, что и такой набор генов может с неплохой достоверностью определять наличие метастазов в лимфоузлах.

ROC - кривая для этого варианта анализа приведена на рисунке 13.

Результаты, приведенные на рисунке 13, показывают, что при исключении из диагностической панели уровней экспрессии эстрогена и прогестерона практически не влияет на эффективность классификации, и два гена - *Ki67*, *HER2/neu* могут обеспечить правильную классификацию в 88%. Этот результат может иметь практическое значение, т.к. диагностические наборы для исследования уровня экспрессии этих генов методом ИГХ являются стандартом для лабораторий патоморфологии онкологических клиник, и, возможно, метод

ИГХ верификации метастазов может быть включен в исследование наравне с геном цитокератина 19.



**Рисунок 13.** ROC - кривая для результатов дискриминантного анализа метастатических и неметастатических лимфоузлов на основании включения в панель 4 генов (*Ki67*, *Her2/neu*, *ESR1*, *PGR* – синяя линия), и исключения из анализа *PGR* – зеленая линия (3 гена), и *ESR1*- красная линия (2 гена)

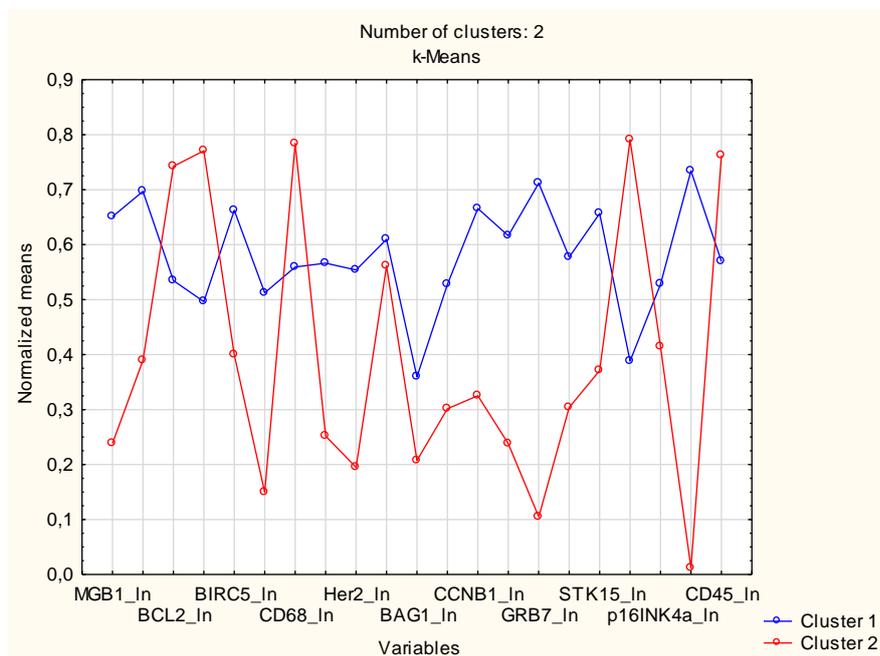
Интересные результаты получены при применении кластеризации результатов анализа уровней экспрессии в объединенной группе лимфоузлов (с и без метастазов, 40 и 90 соответственно).

Если использовать алгоритм кластеризации на основании К-средних (алгоритм, определяющий расстояние между точками (объектами) в n-мерном пространстве (где n-количество характеристик объекта, в нашем случае количество исследованных генов)), то такая «слепая» кластеризация приводит к практически 100% идентификации образцов лимфоузлов в группах: метастатические и неметастатические.

Только один объект (лимфоузел с метастазами) классифицируется неправильно в данном случае. Интересно, что именно для этого лимфоузла обнаружен наиболее низкий уровень экспрессии цитокератина 19.

Анализ уровня экспрессии генов в соответствующих кластерах приведен на Рисунке 14. Анализ отличия средних в полученных кластерах позволяет выбрать

дополнительные гены, для исследования их возможности их включения в диагностическую панель.



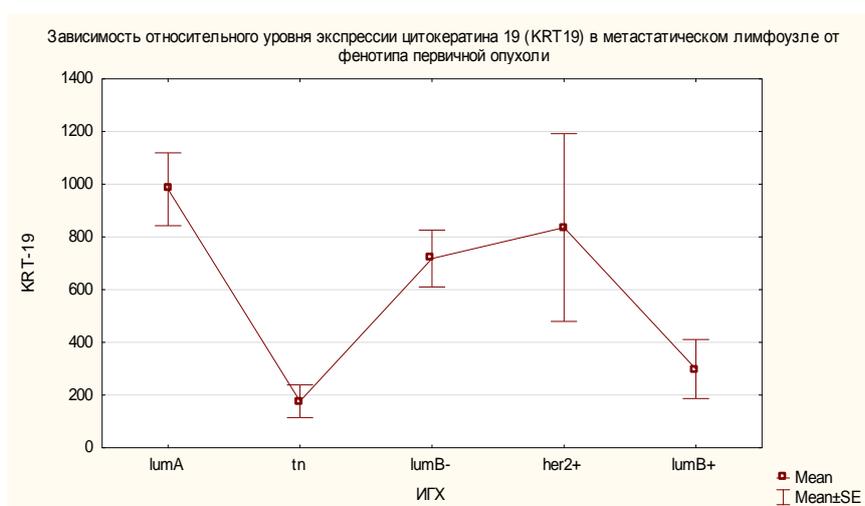
**Рисунок 14.** Средние уровни экспрессии исследованных генов в полученных кластерах при анализе методом К-средних (Кластер 1 - ЛУ с метастазами, Кластер 2 - ЛУ без метастазов)

Интерес могут представлять не только гены, имеющие максимальные отличия средних, но и гены, имеющие разнонаправленные изменения (уменьшение в группе метастатических ЛУ, в отличие от цитокератина 19, уровень которого увеличивается). Это гены маммаглобина, *p16INK4a*, *CD68* и *CD45*. Мы провели анализ изменения диагностической информативности при попеременном включении этих генов в диагностическую пару с цитокератином 19. Наилучшие результаты получены при включении показателей уровня экспрессии гена *CD45*. Результаты дискриминантного анализа для этого варианта приведены в таблице 29. Таким образом, полученная модель классификации имеет 100% специфичность и чувствительность 98,5% при общей информативности 99,2%. Эти цифры близки к лучшим показателям, описанным в литературе.

**Таблица 29.** Дискриминантный анализ метастатических и неметастатических лимфоузлов на основании уровня экспрессии мРНК цитокреатина19 и *CD45*

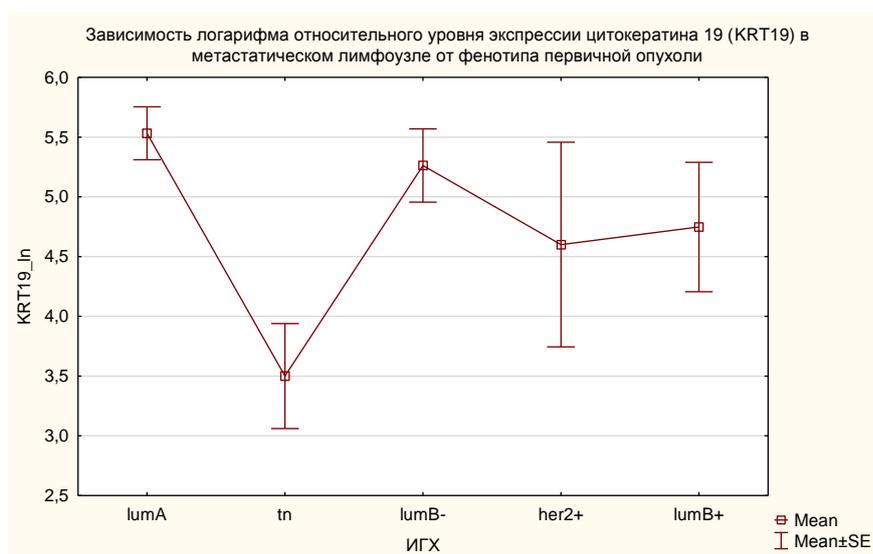
Группа	Правильная классификация, %	ЛУ с низким уровнем экспрессии	ЛУ с высоким уровнем экспрессии
Без метастазов (Л/У N0)	100	40	0
ЛУ с метастазами (Л/У N+)	98,5	1	89
Всего	99,2	41	89

Зависимость уровня экспрессии маркера от фенотипических особенностей опухоли может сказаться на чувствительности маркера в случае метастазов низкодифференцированной опухоли, т.к. снижение дифференцировки опухоли, как правило, приводит к уменьшению уровня экспрессии тканеспецифичных маркеров. Поэтому не исключено, что включение в панель маркеров как высокодифференцированных, так и низкодифференцированных опухолей может значительно повысить ее чувствительность и специфичность.



**Рисунок 15.** Зависимость относительного уровня экспрессии цитокератина 19 (KRT19) в метастатическом лимфоузле от фенотипа первичной опухоли (n=100)

Сокращения на рисунке: lumA – РМЖ люминального фенотипа А; tn – трижды негативный РМЖ; lumB- РМЖ *HER2/neu* негативного люминального фенотипа В; *HER2/neu+* РМЖ *HER2/neu* позитивного фенотипа; lumB+ РМЖ *HER2/neu* позитивного люминального фенотипа В; Mean – среднее значение; SE – стандартная ошибка среднего



**Рисунок 16.** Зависимость логарифма относительного уровня экспрессии цитокератина 19 (*KRT19*) в метастатическом лимфоузле от фенотипа первичной опухоли (n=100)

Анализ зависимостей, приведенных на рисунках 15 и 16, показывает, что действительно, для фенотипов: люминального В+ и тройного негативного рака наблюдается низкий уровень экспрессии цитокератина 19 в метастатических лимфоузлах. Т.к. предложенная нами панель генов успешно определяла метастазы в ЛУ независимо от фенотипа первичной опухоли, мы провели анализ «неуспешной» классификации в нашей выборке. Единственный случай ошибочной классификации метастатического ЛУ для нашей выборки относился к опухоли имеющей люминальный А фенотип, однако, уровень экспрессии цитокератина в ЛУ был у нее минимальным. Таким образом, наши результаты показывали, что, по-видимому, предложенная нами панель генов цитокератин 19 и *CD45* для обнаружения метастазов в ЛУ не зависит от фенотипа опухоли.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диагностика поражения подмышечных лимфатических узлов у больных РМЖ имеет важное значение, т.к. наличие опухолевых изменений в подмышечных лимфатических узлах рассматривается как один из наиболее ранних признаков генерализации опухолевого процесса и играет ключевую роль при дифференциальной диагностике локализованных и местно-распространенных форм РМЖ. Вовлечение в процесс регионарных лимфатических узлов является поводом для индивидуализации выбора тактики противоопухолевого лечения: планируемого объема оперативного вмешательства, необходимости проведения адъювантной и/или неoadъювантной системной терапии. Диагностические методы, позволяющие не только выявлять злокачественный процесс, но и осуществлять контроль за эффектом проводимого лечения, являются наиболее перспективными. К ним относятся методы ядерной медицины, т.е. методы качественной и количественной оценки нарушений метаболических процессов в опухоли и окружающих тканях. ОФЭКТ-КТ (ОФЭКТ, совмещенная с РКТ) является основным методом контроля за эффективностью проводимой полихимиотерапии и лучевого лечения. Механизмом поглощения туморотропных РФП, используемых для ОФЭКТ-КТ, является пассивная диффузия через клеточные мембраны в соответствии с существующим электрическим градиентом и последующее накопление РФП на внутреннем слое функционально активных митохондрий. Можно сказать, что поглощение туморотропных катионных РФП (технетрил, тетрофосмин и др.) отражает энергетическую активность клеток. Биопсия сигнальных лимфатических узлов может рассматриваться в качестве компонента методов ядерной медицины. Впервые об этом методе заговорили в 80-90-е гг. прошлого века. Процент ложноположительных результатов при использовании БСЛУ не превышал 7%. Методология БСЛУ претерпела ряд изменений. Интерстициальное введение красителя с возможностью интраоперационной визуализации в 80% случаев уступило место радионавигации с интра- и перитуморальной инъекцией радиоактивных коллоидных частиц, повысив

информативность метода до 88-90%, совместное же их применение увеличивает вероятность обнаружения СЛУ до 94- 97%. Лимфосцитиграфия, проведенная до оперативного вмешательства, облегчает интраоперационный поиск СЛУ.

Оценка регионарного распространения РМЖ является одним из ключевых факторов, оказывающих влияние на выбор тактики лечения пациентов, в том числе и объем хирургического лечения, в связи с чем методам оценки лимфогенной диссеминации опухоли уделяется большое внимание. Применение современных методов визуализации СЛУ с использованием химических красителей и радиофармпрепаратов позволяет с высокой точностью определить как количество, так и локализацию СЛУ при правильном использовании техники введения РФП (89). В нашем исследовании мы сравнили эффективность трех различных методик визуализации СЛУ как на предоперационном этапе (сцинтиграфия и ОФЭКТ-КТ), так и интраоперационно (гамма-сканер). ОФЭКТ-КТ может стать альтернативой для ПЭТ при контроле за эффективностью проводимой неоадьювантной химиотерапии и лучевого лечения. Основным механизмом поглощения туморотропных РФП, использующихся для ОФЭКТ-КТ, является пассивная диффузия через клеточные мембраны в соответствии с существующим электрическим градиентом и последующее накопление РФП на внутреннем слое функционально активных митохондрий.

На сегодняшний день не существует унифицированной методики предоперационной оценки лимфогенной распространенности опухоли. Биопсия сторожевого лимфоузла представляется наиболее точным и клинически оправданным методом выявления регионарных метастазов, возможности метода позволяют диагностировать также и микрометастазы. Кроме того, введение РФП с последующим определением ближайших лимфатических коллекторов с наибольшим риском метастазирования приводит к более тщательному патоморфологическому исследованию сторожевых лимфоузлов и повышает точность морфологической диагностики (131) (132).

По данным сцинтиграфического исследования локализацию СЛУ при периареолярном введении РФП удалось установить у 126 из 152 пациентов (83%). По окончании исследования участок кожи в проекции СЛУ отмечался маркером. Также была отмечена тенденция к более высокому ИМТ в группе пациентов, у которых исследование было безрезультатным: 32,2 (30,1-34,1) в группе СЛУ- по сравнению с 29,3 (28,1-32) в группе СЛУ+. Таким образом, чувствительность предоперационной сцинтиграфии в нашем исследовании составила 83%.

Интраоперационно повторная детекция РФП в СЛУ осуществлялась с использованием гамма-сканера. При использовании гамма-сканера интраоперационно накопление РФП в сигнальном лимфоузле было обнаружено у 133 из 152 пациентов (87,5%). Как и в случае сцинтиграфии, хотя и в меньшей степени, была отмечена тенденция к увеличению индекса массы тела у пациентов с отрицательными результатами определения СЛУ (32,1; 30,1-33,8) по сравнению с группой сравнения (29,5; 26,1-32). Другим наблюдением, характерным для "СЛУ-негативных" по данным гамма-зонда пациентов, стала локализация опухоли. Влияние других клинико-морфологических признаков на результаты исследования оказалось статистически незначимым ( $p > 0,05$ ).

Наиболее эффективным методом визуализации СЛУ было ОФЭКТ-КТ. Наличие одного (или нескольких СЛУ) удалось определить у 99,34% (151 из 152) пациентов при периареолярном введении. Сочетание с возможностью ОФЭКТ-КТ определения синтопии СЛУ с высокой клинической эффективностью делает этот метод наиболее удобным по сравнению другими исследуемыми методиками. Однако в ряде других исследований не было обнаружено статистически значимой разницы между чувствительностью интраоперационного использования гамма-сканера и ОФЭКТ-КТ (97, 98). Преимущество ОФЭКТ-КТ заключается в большей разрешающей способности и более точном представлении о топографии выявляемых очагов гиперфиксации РФП. Чувствительность ОФЭКТ-КТ исследований при диагностике метастатического поражения подмышечных лимфатических узлов составляла 93,3%. Об изменениях в опухоли свидетельствует

и коэффициент накопления РФП. Биопсия сигнальных лимфатических узлов у пациенток с местнораспространенным РМЖ в настоящее время является предметом дискуссий. Нам представилось интересным определить показания для БСЛУ у больных локорегиональным раком молочной железы. При анализе скинтиграфических изображений с целью определения локализации регионарных лимфатических узлов выделялись три области лимфооттока: подмышечная, включающая в себя подмышечные лимфатические узлы 1-2 уровня, поднадключичная, покрывающая подключичные ЛУ и все ЛУ, локализующиеся выше ключицы, и парастернальная область, состоящая из ЛУ.

Используя полученные сведения, могут быть сформулированы показания к биопсии сигнальных лимфатических узлов в различных клинических ситуациях. При местно-распространенной форме рака молочной железы сокращение оперативного вмешательства до биопсии сигнальных лимфатических узлов возможно лишь у пациентов со статусом cN0 по результатам ОФЭКТ-КТ и радионуклидной визуализации; в остальных случаях рекомендуется выполнять аксиллярную лимфодиссекцию. В настоящем исследовании продемонстрировано, что биопсия сигнальных лимфатических узлов необходима не только пациентам с ранними формами рака, но и при местно-распространенном процессе при условии достижения полной ремиссии со стороны регионарных лимфатических узлов. Исключение инвалидизирующих аксиллярных лимфодиссекций позволяет улучшить качество жизни пациенткам.

Эволюция представлений о гетерогенности рака молочной железы прошла путь от описания различных морфологических типов опухолей и ее морфологических характеристик, таких как размер и наличие регионарных метастазов до исследования уровня экспрессии десятков тысяч генов с целью определения биологического фенотипа, дающего возможность значительно большей стратификации риска прогрессирования РМЖ и выбора тактики адъювантной терапии. Чувствительность новых методов фенотипирования РМЖ

значительно превосходит классические иммуногистохимические маркеры, однако, сложность их использования в клинической практике диктует необходимость экстраполировать результаты многофакторного (до нескольких десятков тысяч генов) анализа на модели иммуногистохимических маркеров, что, естественно, приводит к несоответствию результатов классификаций и, соответственно, стратификация риска прогрессирования, а также выбор тактики лечения остаются необоснованными. Кроме того, гетерогенность опухолевой популяции не позволяет однозначно интерпретировать результаты использования диагностических моделей у пациентов с регионарными метастазами. По этой причине в большинство описанных диагностических моделей не включены пациенты N1 (133).

Диагностические факторы определяют вероятность положительного исхода заболевания на момент хирургического лечения без учета характера адъювантной терапии. Такие факторы, как правило, характеризуют биологическую природу опухоли, пролиферативную активность, метастатический потенциал и др. (134). Классическими клиническими независимыми факторами прогноза РМЖ являются возраст, наличие лимфогенных метастазов в аксиллярной области, размер опухоли, морфологические характеристики (гистологический тип, степень злокачественности, лимфоваскулярная инвазия, ИГХ экспрессия Ki67 и др.) (135), (136), (137).

В отличие от диагностических истинно предиктивные факторы определяют исход заболевания с учетом проводимой терапии, но не в случае отсутствия терапии (135), (134). Некоторые из упомянутых ранее факторов прогноза, такие как степень злокачественности, Ki67, а также уровень ИГХ экспрессии РЭ/РП и Her2/neu, имеют как диагностическое, так и предиктивное значение (138). За исключением Ki67, РЭ/РП и амплификации Her2/neu на сегодняшний день в клинической практике нет молекулярных маркеров, определяющих не прогноз заболевания как таковой, но демонстрирующих вероятную степень

чувствительности опухоли с гормоно- или таргентной терапии (139), (140), (141). Диагностические факторы, как правило, используются с целью верификации пациентов, для которых проведение адьювантной терапии может быть нецелесообразным в виду отсутствия ее влияния на общую/безрецидивную выживаемость; соответственно объем лечения данной категории больных можно ограничить хирургическим лечением (142) (143). Предикторные факторы, напротив, определяют, какая терапия будет наиболее эффективной у данного пациента (144). Традиционно, диагностические и предиктивные факторы рассматриваются в едином контексте с целью определения прогноза заболевания и выбора тактики терапии. В виду сложного характера взаимодействия и низкой чувствительности традиционных методов клинко-морфологической оценки на сегодняшний день не существует консолидированного подхода к формированию панели диагностических/предиктивных факторов для индивидуализации тактики терапии пациента (145).

В этой связи еще одной задачей нашего исследования была разработка панели маркеров для определения метастазов как в сигнальном, так и регионарных лимфатических узлах. В обзоре литературы подробно изложены сведения о современных методах анализа молекулярных маркеров опухоли в ткани лимфоузла. Несмотря на большую популярность данной темы и большое количество научных исследований, в данной области остается большое количество нерешенных задач. В частности, молекулярные методы исследования СЛУ с целью определения маркеров метастазов РМЖ считаются на сегодняшний день наиболее перспективным подходом. Однако отсутствует единое представление о выборе маркера или панели маркеров для включения в диагностическую модель. В нашем исследовании проводился сравнительный анализ специфичности и чувствительности таких маркеров, как уровень экспрессии генов: *KRT19*, *MGB1*, *CTSL2*, *BCL2*, *MYC*, *BIRC5*, *CCND1*, *NDRG1*, *CD68*, *Ki67*, *TERT*, *Her2*, *PTEN*, *BAG1*,

*PGR, CCNB1, ESRI, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, p16INK4a, EGFR, CD45*, а также комбинированные модели экспрессии данных генов.

В первую очередь была исследована чувствительность маркеров в отношении объема ткани метастаза (количество срезов), взятого в исследование. Во многих работах продемонстрирована высокая чувствительность молекулярных маркеров в отношении количества исследуемой ткани (146). Это позволяет проводить дифференциальную диагностику единичных опухолевых клеток, микрометастазов и макрометастазов (147). В нашем исследовании продемонстрирована выраженная положительная корреляция между количеством срезов толщиной 10 мкм (от 1 до 5) и уровнем экспрессии исследуемых маркеров ( $r > 0,7$ ;  $p < 0,001$ ). Эта особенность позволяет предположить наличие определенных клинических перспектив для данных маркеров. Однако нерешенным остается вопрос стабильности уровня экспрессии генов в ткани метастаза в зависимости от фенотипа первичной опухоли. Одной из серьезных проблем, решение которой – перспектива будущих исследований, остается сочетание небольшого объема опухоли (микрометастазы/единичные опухолевые клетки) с низким уровнем экспрессии генов, входящих в диагностическую модель.

Специфичность и чувствительность цитокератина 19 как маркера метастазов РМЖ в ткани лимфатического узла доказана уже давно. Еще в 1994 году Schoenfeld с коллегами опубликовал первое сообщение, в котором указывал, что молекулярный маркер цитокератин-19 (*KRT19*) позволяет с достаточной чувствительностью и специфичностью определять клетки метастазов рака молочной железы в СЛУ (105). Noguchi с коллегами определил, что анализ экспрессии генов *KRT19* и *MUC-1* методом РВ-ПЦР в экспериментальной модели позволяет определить  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  клеток, соответственно (106). В нашем исследовании уровень экспрессии *KRT19* в ткани метастатического лимфоузла составлял  $5,4 \pm 1,9$  условных единиц и статистически значимо превышал этот уровень в ткани интактного лимфоузла. Однако подобное отличие, полученное в рамках настоящего исследования, нельзя считать окончательным утверждением

устойчивой специфичности этого маркера. В ряде исследований (148), посвященных анализу экспрессии генов в различных фенотипах РМЖ, *KRT19* описывается как маркер люминального фенотипа и, следовательно, уровень его экспрессии может зависеть не только от размера метастатического очага, но и от фенотипа первичной опухоли. Таким образом, дополнительное исследование других маркеров (в частности, базального фенотипа) может существенно повысить диагностическую специфичность модели.

мРНК маммаглобина является привлекательной диагностической мишенью по нескольким причинам. Во-первых, продемонстрированные в настоящем исследовании и описанные рядом авторов закономерности экспрессии выгодно отличают его от других маркеров РМЖ, во-вторых, определение экспрессии именно на уровне мРНК обладает рядом преимуществ по сравнению с анализом ДНК и экспрессии белка. Это связано с сочетанием достаточного количества копий мРНК в клетке и высокой чувствительностью метода определения. В частности, количество специфических мРНК молекул в клетке колеблется от 10 до 1000 и более копий. При наличии опухоли объемом 1 мм<sup>3</sup>, что составляет 10<sup>6</sup> клеток, и минимальном уровне апоптоза 10%, в системный кровоток транспортируется порядка 10<sup>3</sup>-10<sup>7</sup> молекул в зависимости от активности транскрипции гена. При максимальном теоретическом объеме циркулирующей крови, составляющем 10000 мл, в 1 мл периферической крови циркулирует в среднем 1000 молекул мРНК, что в несколько раз превышает порог чувствительности ПЦР. Согласно этим расчетам концентрации других возможных маркеров, таких как ДНК и белки, не достигают нижней границы чувствительности методов детекции при аналогичном объеме первичной опухоли. Определение экспрессии мРНК маммаглоина при РМЖ представляет собой интересное сочетание анализа функциональной роли данного гена в процессах метаболизма как нормальной, так и злокачественной клетки. Значительное повышение его экспрессии при РМЖ представляет большой клинический интерес, однако недостатки понимания его биологической роли не позволяют идентифицировать ряд морфологических или биологических признаков,

которые позволили бы диверсифицировать показания для выбора пациентов, для которых анализ был бы максимально информативным.

Маммаглобин по сравнению с цитокератином-19 является более специфическим маркером РМЖ, т.к. экспрессируется эпителиоцитами молочной железы. Значение маммаглобина как маркера прогрессирования рака молочной железы описано во многих исследованиях. Наличие значительных и статистически достоверных отличий экспрессии в клетках РМЖ и уникальный характер изменения экспрессии гена при прогрессировании заболевания представляются крайне привлекательными для клинического использования, однако, за 23 года с момента клонирования гена достаточной информации о клинической и диагностической его ценности так и не накоплено, не говоря уже о том, что его функции также остались неизвестными. Можно лишь предполагать, что экспрессия гена в органах репродуктивной системы является признаком тканеспецифической активности. В ряде исследований количественное определение мРНК-транскриптов кодируемого геном белка *hMAM* использовалось для определения единичных опухолевых клеток в лимфоузлах (169, 170). Также *hMAM* рассматривается в качестве возможной мишени для создания препаратов таргетной терапии (18-20). В тоже время большое количество клеточных линий рака молочной железы не экспрессируют маммаглобин. По результатам нашего исследования уровень экспрессии маммаглобина в ткани метастатического лимфоузла был статистически значимо выше, по сравнению с интактным, что подтверждается результатами других исследований (157, 171). Добавление этого маркера в диагностическую панель в паре с цитокератином повышает информативность обнаружения метастазов в лимфоузлах до 97,8%, однако до конца не решает задачи увеличения чувствительности теста. Это связано с тем, что имеется ненулевая экспрессия маммаглобина и в метастатических лимфоузлах. Т.е. маммаглобин хоть и считается тканеспецифическим маркером, но по сравнению с цитокератином не абсолютным. Поэтому мы исследовали уровень экспрессии группы генов (21 ген), входящих в панель прогноза рецидивирования РМЖ,

проходящего регистрацию в РФ. Ранее было показано, что данный набор генов может использоваться и для определения молекулярного фенотипа опухоли (172). Уровень экспрессии большого числа ткане- и опухолеспецифических маркеров (*KRT19, MGB1, CTSL2, BCL2, MYC, BIRC5, CCND1, NDRG1, CD68, Ki67, Her2, BAG1, PGR, CCNB1, ESR1, GRB7, MMP11, STK15, MYBL2, p16INK4a, EGFR, CD45*) статистически значимо различался в метастатических и неметастатических лимфоузлах ( $p < 0,05$ ). Анализ экспрессии этой группы генов в метастатических и неметастатических ЛУ позволил выявить гены, имеющие разнонаправленные изменения, по сравнению с геном цитокератина. Включение гена *CD45* в диагностическую пару вместе с цитокератином позволило увеличить информативность теста до 99,2%. Следует отметить, что такая комбинация генов в ПЦР тесте для определения метастазов рака в ЛУ ранее никем не предлагалась и является оригинальной.

Использование комбинированной модели молекулярных маркеров метастаза РМЖ в ткани лимфатического узла позволяет в значительной степени повысить эффективность хирургического лечения рака молочной железы и добиться адекватности объема ЛАЭ с одновременным снижением риска послеоперационных осложнений.

## ВЫВОДЫ:

1. Чувствительность ОФЭКТ-КТ в отношении визуализации СЛУ (99,3%) выше по сравнению с гамма-камерой и гамма-зондом. Дополнительное выполнение ОФЭКТ-КТ позволяет четко визуализировать сторожевые лимфатические узлы.

2. Уровень экспрессии большого числа ткане- и опухолеспецифических маркеров (*KRT19*, *MGB1*, *CTSL2*, *BCL2*, *MYC*, *BIRC5*, *CCND1*, *NDRG1*, *CD68*, *Ki67*, *Her2*, *BAG1*, *PGR*, *CCNB1*, *ESR1*, *GRB7*, *MMP11*, *STK15*, *MYBL2*, *p16INK4a*, *EGFR*, *CD45*) статистически значимо различался в метастатических и неметастатических лимфоузлах ( $p < 0,05$ ).

3. Диагностические модели, основанные на экспрессии ткане- и опухолеспецифических маркеров (*KRT19*; *KRT19+MGB*; *Ki67+HER2/neu*; *KRT19+CD45*), показали высокую чувствительность (95,6%; 97,2%; 88,5%; 98,5% соответственно) и специфичность (100%; 100%; 87,5%; 100% соответственно) в отношении дифференциальной диагностики метастатических и неметастатических лимфоузлов.

4. Комбинация генов *KRT19* и *CD45* по своей чувствительности (98,5%) и специфичности (100%) является оптимальной диагностической моделью для верификации метастазов в СЛУ (общая информативность составила 99,2%), что позволяет рекомендовать ее использование в клинической практике для диагностики метастазов как в СЛУ, так и в регионарных лимфоузлах.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. При отсутствии визуализации СЛУ на планарных сцинтиграммах рекомендуется использовать высокочувствительный метод определения СЛУ – ОФЭКТ-КТ.
2. Для определения метастатического поражения СЛУ в качестве дополнительного метода рекомендуется использование молекулярно-генетического теста, основанного на определении уровня экспрессии маркера *KRT19* в комбинации с *CD45*.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ЕОК — единичные опухолевые клетки;
- ИГХ — иммуногистохимическое исследование;
- ИМТ – индекс массы тела;
- кДНК – комплементарная ДНК;
- ЛАЭ – лимфаденэктомия;
- МкМ — микрометастазы;
- мРНК — матричная РНК;
- МРТ — магнитно-резонансная томография;
- о.е. — относительные единицы экспрессии;
- ОФЭКТ-КТ — однофотонная эмиссионная компьютерная томография;
- ПЭТ – позитронная эмиссионная томография;
- РВ-ПЦР – полимеразная цепная реакция в реальном времени;
- РМЖ — рак молочной железы;
- РП — белок-рецептор прогестерона;
- РЭ - белок-рецептор эстрогена;
- СЛУ — сигнальный лимфоузел;
- УЗИ — ультразвуковое исследование;
- CD45* - пан-лейкоцитарный маркер;
- DCIS - Ductal Carcinoma In Situ (неинвазивный протоковый рак)
- FAM – карбоксифлуоресцеин;
- KRT19* — цитокератин-19;
- ТЕ-буфер – буферный раствор трис аминокетана и четырехосновной карбоновой кислоты;

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein, Mary Cianfrocca and Lori J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist*. 2004 г., Т. 9, 6, стр. 606-616.
2. Fayer V.A., Guerra M.R., Cintra J.R.D., Bustamante-Teixeira M.T. Ten-year survival and prognostic factors for breast cancer in the southeast region of Brazil. *Rev. bras. epidemiol.* 2016 г., Т. 19, 4 São Paulo Oct./Dec.
3. Kontani K., Hashimoto S-i., Murazawa C., Norimura S., et al. Factors responsible for long-term survival in metastatic breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology*. 2014 г., Т. 12, 344.
4. Khanfir A., Lahiani F., Bouzguendaa R. et al. Prognostic factors and survival in metastatic breast cancer: A single institution experience. *Reports of practical oncology and radiotherapy*. 2013 г., Т. 1, 8, стр. 127–132.
5. Giuliano AE, Jones RC, Brennan M, et al. Sentinel lymphadenectomy in breast cancer. *J Clin Onco.* 1997 г., Т. 15, стр. 2345-2350.
6. Veronesi U, Paganelli G, Viale G, et al. A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med*. 2003 г., Т. 349, стр. 546-553.
7. Armando E. Giuliano, Daniel M. Kirgan, J. Michael Guenther. Lymphatic Mapping and Sentinel Lymphadenectomy for Breast Cancer. *Annals of surgery*. 1994 г., Т. 220, 3, стр. 393-401.
8. Erika A. Newman, Lisa A. Newman. Lymphatic Mapping Techniques and Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer. *Surg Clin N Am*. 2007 г., Т. 87, стр. 353-364.
9. Galimberti V, Cole BF, Zurrída S, Viale G, Luini A, Veronesi P, Baratella P, Chifu C, Sargenti M, Intra M, Gentilini O, Mastropasqua MG, Mazzarol G, Massarut S, Garbay JR, Zgajnar J, Galatius H, Recalcati A, Littlejohn D, Bamert M, Colleoni M, Price KN. Axillary dissection versus no axillary dissection in patients with sentinel-node micrometastases (IBCSG 23-01): a phase 3 randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* 2013 г., Т. 14, 4, стр. 297-305.
10. Veronesi U, Viale G, Paganelli G, Zurrída S, Luini A, Galimberti V, Veronesi P, Intra M, Maisonneuve P, Zucca F, Gatti G, Mazzarol G, De Cicco C, Vezzoli D. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: ten-year results of a randomized controlled study. *Ann Surg*. 2010 г., Т. 251, 4, стр. 595-600.

11. Gary H. Lyman, Armando E. Giuliano, Mark R. Somerfield, Al B. Benson III, Diane C. Bodurka, et al. American Society of Clinical Oncology Guideline Recommendations for Sentinel Lymph Node Biopsy in Early-Stage Breast Cancer. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*. 2005 г., Т. 23, 30.
12. McCreedy DR, Yong WS, Ng AK, et al. Influence of the new AJCC breast cancer staging system on sentinel lymph node positivity and false-negative rates. *J Natl Cancer Inst*. 2004 г., Т. 96, стр. 873-875.
13. Lacroix, M. Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endocrine-Related Cancer*. 2006 г., Т. 13, 4, стр. 1033–1067.
14. Murawski M., Woźniak M., Duś-Szachniewicz K. et al. Significance of Matrix Metalloproteinase 9 Expression as Supporting Marker to Cytokeratin 19 mRNA in Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016 г., Т. 17, стр. 571. doi:10.3390/ijms17040571.
15. Tamaki Y, Akiyama F, Iwase T, et al. Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res*. 2009 г., Т. 15, стр. 2879–84.
16. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России. 2017 г., стр. 18.
17. Elkin EB, Hudis C, Begg CB, Schrag D. The effect of changes in tumor size on breast carcinoma survival in the US: 1975-1999. *Cancer*. 2005 г., Т. 104, 6, стр. 1149-1157.
18. Fenton JJ, Abraham L, Taplin SH, et al. Breast Cancer Surveillance Consortium. Effectiveness of computer-aided detection in community mammography practice. *J Natl Cancer Inst*. 2011 г., Т. 103, 15, стр. 1152-1161.
19. Blumencranz P, Whitworth P, Deck K, et al. Sentinel node staging for breast cancer: intra-operative molecular pathology overcomes conventional histologic sampling errors. *Am J Surg*. 2007 г., Т. 194, стр. 426–32.
20. A. Pinero, J. Giménez, S. Vidal-Sicart, and M. Intra. Selective sentinel lymph node biopsy and primary systemic therapy in breast cancer. *Tumori*. 2009 г., Т. 96, 1, стр. 17–23.
21. В.Ф. Семиглазов, В.В. Семиглазов, Г.А. Дашян. ПРОБЛЕМЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (Целесообразность

- биопсии сигнальных лимфатических узлов. Местное хирургическое лечение при определяемых отдаленных метастазах). ПРАКТИЧЕСКАЯ ОНКОЛОГИЯ. 2011 г., Т. 11, 4, стр. 217-220.
22. A. M. Kelly, B. Dwamena, P. Cronin, and R. C. Carlos. Breast cancer sentinel node identification and classification after neoadjuvant chemotherapy -systematic review and metaanalysis. *Academic Radiology*. 2009 г., Т. 16, 5, стр. 551–563.
23. В.П. Харченко, Н.И. Рожкова. Маммология. Национальное руководство. Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2009. стр. 177-180.
24. Stephanie A. Valente, Gary M. Levine et al. Accuracy of Predicting Axillary Lymph Node Positivity by Physical Examination, Mammography, Ultrasonography, and Magnetic Resonance Imaging. *Ann Surg Oncol*. 2012 г.
25. Ahmed M, Usiskin S I, Hall-Craggs M A and Douek M. Is imaging the future of axillary staging in breast cancer? *Eur. Radiol*. 2014 г., Т. 24, стр. 288–93.
26. al., Soledad Alvarez et. Role of Sonography in the Diagnosis of Axillary Lymph Node Metastases in Breast Cancer: A Systematic Review. *AJR*. 2006 г., Т. 186, стр. 1342–1348.
27. Dogan B.E., Dryden M.J., Wei W., Fornage B.D., Buchholz T.A., Smith B., Hunt K., Sonography and Sonographically Guided Needle Biopsy of Internal Mammary Nodes in Staging of Patients With Breast Cancer. *AJR Am J*. 2015 г., Т. 205, 4, стр. 905-11.
28. Brennan, A. J. Spillane and M. E. Accuracy of sentinel lymph node biopsy in large and multifocal/multicentric breast carcinoma—a systematic review. *European Journal of Surgical Oncology*. 2011 г., Т. 37, 5, стр. 371–385.
29. Kvistad KA, Rydland J, Smethurst HB, Lundgren S, Fjøsne HE, Haraldseth O. Axillary lymph node metastases in breast cancer: preoperative detection with dynamic contrast-enhanced MRI. *Eur Radiol*. 2000 г., Т. 10, 9, стр. 1464-71.
30. Chung J, Youk JH, Kim JA, Gweon HM, Kim EK, Ryu YH, Son EJ. Role of diffusion-weighted MRI: predicting axillary lymph node metastases in breast cancer. *Acta Radiol*. 2013 г., Т. in print.
31. Ferna´ndez AG, Fraile M, Gime´nez N, et al. Use of axillary ultrasound, ultrasound-fine needle aspiration biopsy and magnetic resonance imaging in the preoperative triage

of breast cancer patients considered for sentinel node biopsy. *Ultrasound Med. Biol.* 2011 г., Т. 37, стр. 16–22.

32. Kvistad KA, Rydland J, Smethurst HB, Lundgren S, Fjosne HE, Haraldseth O. Axillary lymph node metastases in breast cancer: preoperative detection with dynamic contrast-enhanced MRI. *Eur Radiol.* 2000 г., Т. 10, стр. 1464–71.

33. Yasuhiro Tamaki, Futoshi Akiyama, Takuji Iwase, Tomoyo Kaneko, Hitoshi Tsuda, Kazuhiko Sato, Shigeto Ueda, Masayuki Mano. Molecular Detection of Lymph Node Metastases in Breast Cancer Patients: Results of a Multicenter Trial Using the One-Step Nucleic Acid Amplification Assay. *Clin Cancer Res.* 2009 г., Т. 15, стр. 2879.

34. Harnan SE, Cooper KL, Meng Y, Ward SE, Fitzgerald P, Papaioannou D, Ingram C, Lorenz E, Wilkinson ID, Wyld L. Magnetic resonance for assessment of axillary lymph node status in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Surg Oncol.* 2011 г., Т. 37, 11, стр. 928-36.

35. Li C, Meng S, Yang X, Wang J and Hu J. The value of T2\* in differentiating metastatic from benign axillary lymph nodes in patients with breast cancer—a preliminary in vivo study. *PLoS One.* 2014 г., Т. 9, стр. e84038.

36. Menezes G L, Knuttel F M, Stehouwer B L, Pijnappel R M and van den Bosch M A. Magnetic resonance imaging in breast cancer: a literature review and future perspectives. *World J. Clin. Oncol.* 2014 г., Т. 5, стр. 61-70.

37. Kuijs V J L, Moosdorff M, Schipper R J, Beets-Tan R G H, Heuts E M, Keymeulen K B M I, Smidt M L and Lobbes M B I. The role of MRI in axillary lymph node imaging in breast cancer patients: a systematic review. *Insights Imaging.* 2015 г., Т. 6, 203-15.

38. van Heijst T.C. F., Eschbach-Zandbergen D., Hoekstra N., van Asselen B., Lagendijk J. J. W., Verkooijen H. M., Pijnappel R. M., de Waard S.N., Witkamp A. J., van Dalen T. Supine MRI for regional breast radiotherapy: imaging axillary lymph nodes before and after sentinel-node biopsy. *Physics in Medicine & Biology.* 2017 г., Т. 62, 16.

39. Carlson RW, Anderson BO, Bensinger W, et al. National Comprehensive Cancer Network. NCCN practice guidelines for breast cancer. *Oncology.* 2000 г., Т. 14, 11A, стр. 33-49.

40. Cutress RI, McDowell A, Gabriel FG, et al. Observational and cost analysis of the implementation of breast cancer sentinel node intraoperative molecular diagnosis. *J Clin Pathol.* 2010 г., Т. 63, стр. 522–9.

41. G., Cserni. What is a positive sentinel node in a breast cancer patient? A practical approach. *Breast*. 2007 г., Т. 16, стр. 152–60.
42. Petrasek AJ, Semple JL, McCready DR. The surgical and oncologic significance of the axillary arch during axillary lymphadenectomy. *Can J Surg*. 1997 г., Т. 40, 1, стр. 41-47.
43. Pogson CJ, Adwani A, Ebbs SR. Seroma following breast cancer surgery. *Eur J Surg Oncol*. 2003 г., Т. 29, 9, стр. 711–7.
44. D. N. Krag, S. J. Anderson, T. B. Julian et al.,. Technical outcomes of sentinel-lymph-node resection and conventional axillary-lymph-node dissection in patients with clinically node-negative breast cancer: results from the NSABP B-32 randomised phase III trial. *The Lancet Oncology*. 2007 г., Т. 8, 10, стр. 881–888.
45. T. J. Meretoja, P. S. Heikkilä, K. Salmenkivi, et al. Outcome of patients with ductal carcinoma in situ and sentinel node biopsy. *Annals of Surgical Oncology*. 2012 г., Т. 19, 7, стр. 2345–2351.
46. Galimberti V, Chifu C, Rodriguez Perez S, Veronesi P, Intra M, Botteri E, Mastropasqua M, Colleoni M, Luini A, Veronesi U. Positive axillary sentinel lymph node: is axillary dissection always necessary? *Breast*. 2011 г., Т. Suppl 3, стр. S96-8.
47. Somers R, Jablon L, Kaplan M. The use of closed suction drainage after lumpectomy and axillary dissection for breast cancer: a prospective randomized trial. *Ann Surg*. 1992 г., Т. 215, стр. 146–9.
48. Angelique F. Vitug, Lisa A. Newman. Complications in Breast Surgery. *Surg Clin N Am*. 2007 г., Т. 87, стр. 431–451.
49. Giuliano AE, Haigh PI, Brennan MB, et al. Prospective observational study of sentinel lymphadenectomy without further axillary dissection in patients with sentinel node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2000 г., Т. 18, 13, стр. 2553–9.
50. Erickson VS, Pearson ML, Ganz PA, et al. Arm edema in breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 2001 г., Т. 93, 2, стр. 96–111.
51. Beaulac SM, McNair LA, Scott TE, et al. Lymphedema and quality of life in survivors of early-stage breast cancer. *Arch Surg*. 2002 г., Т. 137, 11, стр. 1253–7.
52. Groen RS, Oosterhuis AW, Boers JE. Pathologic examination of sentinel lymph nodes in breast cancer by a single haematoxylin-eosin slide versus serial sectioning and

- immunocytokeratin staining: clinical implications. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 г., Т. 105, стр. 1–5.
53. Guldroz JA, Johnson MT, Scott-Conner C, et al. The use of touch preparation for the evaluation of sentinel nodes in breast cancer. *Am J Surg.* 2010 г., Т. 199, стр. 792–6.
54. Moskovitz AH, Anderson BO, Yeung RS, et al. Axillary web syndrome after axillary dissection. *Am J Surg.* 2001 г., Т. 181, 5, стр. 434–9.
55. Zahoor S., Haji A., Battoo A., Qurieshi M., Mir W. and Shah M. Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer: A Clinical Review and Update. *J Breast Cancer.* 2017 г., Т. 20, 3, стр. 217–227.
56. Lyman G.H., Temin S., Edge S.B., Newman L.A., Turner R.R., Weaver D.L., et al. Sentinel lymph node biopsy for patients with early-stage breast cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2014 г., Т. 32, стр. 1365–1383.
57. Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL. *Sabiston Textbook of Surgery. The Biological Basics of Modern Surgical Practice*, 16th ed. Philadelphia, PA : W. B. Saunders, 2001.
58. Dixon JM, ed. Sentinel node biopsy. In: Galimberti V, Gennari R, Zerwes F. *Breast Cancer: Diagnosis and Management.* New York : Elsevier Science, 2000.
59. Feig BW, Berger DH, Fuhrman GM. *The M. D. Anderson Surgical Oncology Handbook.* 3rd edition. Baltimore, Maryland : Williams, and Wilkins, 2004.
60. Rovera F, Frattini F, Marelli M, et al. Axillary sentinel node biopsy: an overview. *Int J Surg.* 2008 г., Т. suppl 1, стр. :S109-112.
61. S. Klingler, F. Marcha P. Rauch, O. Kenouchi A. S. Chrétien P. Genin<sup>2</sup>, A. Leroux and J. L. Merlin. Using one-step nucleic acid amplification (OSNA) for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients avoids second surgery and accelerates initiation of adjuvant therapy. *Ann Oncol.* 2013 г.
62. Tanis, P. J., Nieweg, O. E. и Valdes Olmos, R. A. & Kroon, B. B. Anatomy and physiology of lymphatic drainage of the breast from the perspective of sentinel node biopsy. *J. Am. Coll. Surg.* 2001 г., Т. 192, стр. 399-409.
63. Macéa, J. R. & Fregnani, J. H. T. G. Anatomy of the thoracic wall, axilla and breast. *Int. J. Morphol.,.* 2006 г., Т. 24, 4, стр. 691-704.

64. Cheon H, Kim HJ, Lee SW, Kim DH, Lee CH, Cho SH, et al. Internal mammary node adenopathy on breast MRI and PET/CT for initial staging in patients with operable breast cancer: prevalence and associated factors. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 г., 160, стр. 523–530.
65. Habraken V, van Nijnatten TJ, de Munck L, Moosdorff M, Heuts EM, Lobbes MB, et al. Does the TNM classification of solitary internal mammary lymph node metastases in breast cancer still apply? *Breast Cancer Res Treat.* 2017 г., T. 161, стр. 483–489.
66. Thorsen LB, Offersen BV, Dano H, Berg M, Jensen I, Pedersen AN, et al. DBCG-IMN: a population-based cohort study on the effect of internal mammary node irradiation in early node-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2016 г., T. 34, стр. 314–320.
67. G. Cheng, S. Kurita, D. A. Torigian, and A. Alavi. Current status of sentinel lymph-node biopsy in patients with breast cancer. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging.* 2011 г., T. 38, 3, стр. 562–575.
68. J. Rodriguez Fernandez, S. Martella, G. Trifirò et al. Sentinel node biopsy in patients with previous breast aesthetic surgery. *Annals of Surgical Oncology.* 2009 г., T. 16, 4, стр. 989–992.
69. M. Noguchi, M. Inokuchi, and Y. Zen. Complement of peritumoral and subareolar injection in breast cancer sentinel lymph node biopsy. *Journal of Surgical Oncology.* 2009 г., T. 100, 2, стр. 100–105.
70. Mansel RE, Goyal A, Douglas-Jones A, et al. Detection of breast cancer metastasis in sentinel lymph nodes using intra-operative real time GeneSearch BLN Assay in the operating room: results of the Cardiff study. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 г., T. 115, стр. 595–600.
71. Kuwert, Giuliano Mariani & Laura Bruselli & Torsten. A review on the clinical uses of SPECT/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015 г., T. 15, 4, стр. 453-468.
72. de Boniface J, Frisell J, Bergkvist L, Andersson Y. Swedish Breast Cancer Group and the Swedish Society of Breast Surgery. Ten-year report on axillary recurrence after negative sentinel node biopsy for breast cancer from the Swedish Multicentre Cohort Study. *Br J Surg.* 2017 г., T. 104, 3, стр. 238–247.
73. Karakatsanis A, Daskalakis K, Stålberg P, Olofsson H, Andersson Y, Eriksson S, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as the sole method for sentinel node biopsy detection in patients with breast cancer. *Br J Surg.* 2017 г., T. 104, 12, стр. 1675–1685.

74. Karakatsanis A, Christiansen PM, Fischer L, Hedin C, Pistoli L, Sund M, et al. The Nordic SentiMag trial: a comparison of super paramagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles versus Tc(99) and patent blue in the detection of sentinel node (SN) in patients with breast cancer and a meta-analysis of earlier studies. *Breast Cancer Res Treat.* 2016 г., Т. 157, 2, стр. 281–294.
75. Teshome M, Wei C, Hunt KK, Thompson A, Rodriguez K, Mittendorf EA. Use of a magnetic tracer for sentinel lymph node detection in early-stage breast cancer patients: a meta-analysis. *Ann Surg Oncol.* 2016 г., Т. 23, 5, стр. 1508–1514.
76. Zografos, George M Filippakis and George. Contraindications of sentinel lymph node biopsy: Are there any really? *World Journal of Surgical Oncology.* [В Интернете] 2007 г. <http://www.wjso.com/content/5/1/10>.
77. I.T., Rubio. Sentinel lymph node biopsy after neoadjuvant treatment in breast. *Eur J Surg Oncol.* 2016 г., Т. 42, 3, стр. 326-32.
78. Chao C, Wong SL, Ackermann D, et al. Utility of intraoperative frozen section analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Am J Surg.* 2001 г., Т. 182, стр. 609–15.
79. L. Vermeeren, I. M. C. Van Der Ploeg, R. A. Valdés Olmos et al. SPECT/CT for preoperative sentinel node localization. *Journal of Surgical Oncology.* 201 г., Т. 101, 2, стр. 184–190.
80. III, Cody HS. Clinical aspects of sentinel node biopsy. *Breast Cancer Res.* 2001 г., Т. 3, стр. 104-108.
81. Veronesi U, Paganelli G, Giuseppe V, et al. A randomized comparison of sentinel node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003 г., Т. 349, стр. 546–53.
82. Linda Zetterlund, Stefan Gabrielson, Rimma Axelsson, Jana de Boniface, Jan Frisell, Annie Olsson and Fuat Celebioglu. Impact of previous surgery on sentinel lymph node mapping: Hybrid SPECT/CT before and after a unilateral diagnostic breast excision. *The Breast.* 2016 г., Т. 30, стр. 32-38.
83. Pei-Sheng He, Feng Li, Guan-Hua Li, Can Guo and Tian-Jin Chen. The combination of blue dye and radioisotope versus radioisotope alone during sentinel lymph node biopsy for breast cancer: a systematic review. *BMC Cancer.* 2016 г., Т. 16, 1, стр. 57-63.

84. Krag DN, Julian TB, Harlow SP, et al. NSABP-32: phase III, randomized trial comparing axillary resection with sentinel lymph node resection: a description of the trial. *Ann Surg Oncol*. 2004 г., Т. 11S, стр. 208–10.
85. Takamaru Ashikaga, David N Krag, Stephanie R Land. Morbidity Results from the NSABP B-32 Trial Comparing Sentinel Lymph Node Dissection versus Axillary Dissection. *J Surg Oncol*. Т. 102, 2, стр. 111–118.
86. Thomas B. Julian, Stewart J. Anderson, David N. Krag, Seth P. Harlow, Joseph P. Costantino, Takamaru Ashikaga, Donald L. Weaver, Eleftherios P. Mamounas and Norman Wolmark. 10-yr follow-up results of NSABP B-32, a randomized phase III clinical trial to compare sentinel node resection (SNR) to conventional axillary dissection (AD) in clinically node-negative breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*. 2013 г., Т. 31, 15, стр. suppl 1000.
87. Stell VH, Flippo-Morton TS, Norton HJ, et al. Effect of intraoperative radiocolloid injection on sentinel lymph node biopsy in patients with breast cancer. *Ann Surg Oncol*. 2009 г., Т. 16, стр. 2300-2304.
88. Hughes SJ, Liqiang X, Raja S, et al. A rapid, fully automated, molecular-based assay accurately analyzes sentinel lymph nodes for the presence of metastatic breast cancer. *Ann Surg*. 2006 г., Т. 143, стр. 389–98.
89. Koukouraki S, Sanidas E, Askoxilakis J, et al. Is there any benefit from sentinel lymph node biopsy using the combined radioisotope/dye technique in breast cancer patients with clinically negative axilla? *Nucl Med Commun*. 2008 г., Т. 30, стр. 48-53.
90. Mariani, G. A review on the clinical uses of SPECT/CT / G. Mariani, L. Bruselli, T. Kuwert, E.E. Kim, A. Flotats, O. Israel, M. Dondi, N. Watanabe. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2010 г., Т. 37, 10, стр. 1959-85.
91. Degnim AC, Griffith KA, Sabel MS, et al. Clinicopathologic features of metastasis in nonsentinel lymph nodes of breast carcinoma patients. *Cancer*. 2003 г., Т. 98, стр. 2307–15.
92. Pargaonkar AS, Beissner RS, Snyder S, et al. Evaluation of immunohistochemistry and multiple-level sectioning in sentinel lymph nodes from patients with breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 г., Т. 127, стр. 701–5.
93. Hawkins, S.C., Brown, I., King, P. et al.,. Time to go wireless? A 15-year single institution experience of radioisotope occult lesion localisation (ROLL) for impalpable breast lesions. *Eur J Surg Oncol*. 2017 г., 43, стр. 62–67.

94. Daan Hellingman, Oi Yan Wan, Berlinda J. de Wit-van der Veen, Iris M. van der Ploeg, Paula H.M. Elkhuisen, Emiel J.Th. Rutgers and Marcel P.M. Stokkel,. Predictive risk factors for sentinel lymph node nonvisualization on planar lymphoscintigraphy using an intratumoral injection in patients with primary breast cancer. *Nuclear Medicine Communications*. 2019 г., Т. 40, 4, стр. 317-324.
95. S. Vidal-Sicart, O. Roberto Brouwer, and R. A. Valdés-Olmos. Evaluation of the sentinel lymph node combining SPECT/CT with the planar image and its importance for the surgical act. *Revista Espanola de Medicina Nuclear*. 2011 г., Т. 30, стр. 331–337.
96. Wilke LG, McCall LM, Posther KE, et al. Surgical complications associated with sentinel lymph node biopsy: results from a prospective international cooperative group trial. *Ann Surg Oncol*. 2006 г., Т. 13, 4, стр. 491–500.
97. Silverstein MJ, Recht A, Lagios M, et al. Special report: consensus conference III. Image-detected breast cancer: state-of-the-art diagnosis and treatment. *J Am Coll Surg*. 2009 г., Т. 209, стр. 504–20.
98. I. G. M. Poodt, G. Vugts, R. J. Schipper, R. M. H. Roumen, H. J. T. Rutten, A. J. G. Maaskant- Braat, A. C. Voogd, G. A. P. Nieuwenhuijzen, E. J. T. Luiten, E. J. T. Rutgers, M. T. F. D. Vrancken- Peeters, M. Bessems, J. M. Klaase, S. Muller, A. B. Francken. Prognostic impact of repeat sentinel lymph node biopsy in patients with ipsilateral breast tumour recurrence. *BJS*. 2019 г., Т. 106, 5, стр. 574-585.
99. V. Habraken, T. J. A. van Nijnatten, L. de Munck, M. Moosdorff, E. M. Heuts, M. B. I. Lobbes and M. L. Smidt. Does the TNM classification of solitary internal mammary lymph node metastases in breast cancer still apply? *Breast Cancer Research and Treatment*. 2016 г., Т. 161, 3, стр. 483-489.
100. anghans, L., Tvedskov, T.F., Klausen, T.L. et al. Radioactive seed localisation or wire-guided localisation of nonpalpable invasive and in situ breast cancer: a randomized, multicenter, open-label trial. *Ann Surg*. 2017 г., Т. 266, стр. 29–35.
101. Chan, B.K., Wiseberg-Firtell, J.A., Jois, R.H., Jensen, K., Audisio, R.A. Localisation techniques for guided surgical excision of non-palpable breast lesions. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 г., Т. CD009206.
102. Samine Sahbai, Florin-Andrei Taran, Annette Staebler, Diethelm Wallwiener, Christian la Fougère, Sara Brucker and Helmut Dittmann. Sentinel lymph node mapping using SPECT/CT and gamma probe in endometrial cancer: an analysis of parameters

affecting detection rate. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2017 г., Т. 44, 9, стр. 1511-1519.

103. Tew K, Irwig L, Matthews A, et al. Meta-analysis of sentinel node imprint cytology in breast cancer. *Br J Surg*. 2005 г., Т. 92, стр. 1068–80.

104. Ted A. James, Alex R. Coffman, Anees B. Chagpar, Judy C. Boughey, V. Suzanne Klimberg, Monica Morrow, Armando E. Giuliano and Seth P. Harlow. Troubleshooting Sentinel Lymph Node Biopsy in Breast Cancer Surgery. *Annals of Surgical Oncology*. 2016 г., Т. 23, 11, стр. 3459-3466.

105. Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by using polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 1994 г., Т. 54, стр. 2986–90.

106. Noguchi S, Aihara T, Motomura K, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Am J Pathol*. 1996 г., Т. 148, стр. 649–56.

107. Mammaglobin, a mammary-specific member of the uteroglobin gene family, is overexpressed in human breast cancer. Watson M, Fleming T. 56, 1996 г., *Cancer Res*, стр. 860-865.

108. Veys I, Majjaj S, Salgado R, et al. Evaluation of the histological size of the sentinel lymph node metastases using RT-PCR assay: a rapid tool to estimate the risk of non-sentinel lymph node invasion in patients with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 г., Т. 124, стр. 599–605.

109. Veys I, Durbecq V, Majjaj S, et al. Eighteen months clinical experience with the GeneSearch breast lymph node assay. *Am J Surg*. 2009 г., Т. 198, стр. 203–9.

110. Wascher RA, Bostick PJ, Huyn KT, et al. Detection of MAGE-A3 in breast cancer patients' sentinel lymph nodes. *Br J Cancer*. 2001 г., Т. 85, стр. 1340–8.

111. Manzotti M, Dell'Orto P, Maisonneuve P, et al. Reverse transcription-polymerase chain reaction assay for multiple mRNA markers in the detection of breast cancer metastases in sentinel lymph nodes. *Int J Cancer*. 2001 г., Т. 95, стр. 307–12.

112. Inokuchi M, Ninomiya U, Tsugawa K, et al. Quantitative evaluation of metastases in axillary lymph nodes of breast cancer. *Br J Cancer*. 2003 г., Т. 89, стр. 1750–6.

113. Weigelt B, Verdujin P, Bosma AJ, et al. Detection of metastases in sentinel lymph nodes of breast cancer patients by multiple mRNA markers. *Br J Cancer*. 2004 г., Т. 90, стр. 1531–7.
114. van Rijk MC, Peterse JL, Niewig OE, et al. Additional axillary metastases and stage migration in breast cancer patients with micrometastases or submicrometastases in sentinel lymph nodes. *Cancer*. 2006 г., Т. 107, стр. 467–71.
115. Keyvani S., Karimi N., Orafa Z., Bouzari S., Oloomi M. Assessment of Cytokeratin-19 Gene Expression in Peripheral Blood of Breast Cancer Patients and Breast Cancer Cell Lines. *Biomarkers in Cancer*. 2016 г., Т. 8, стр. 57-63.
116. Gillanders WE, Mikhitarian K, Hebert R, et al. Molecular detection of micrometastatic breast cancer in histopathology-negative axillary lymph nodes correlates with traditional predictors of prognosis. An interim analysis of a prospective multi-institutional cohort study. *Ann Surg*. 2004 г., Т. 239, стр. 828–40.
117. Mikhitarian K, Hebert Martin R, Mitas M, et al. Molecular analysis improves sensitivity of breast sentinel lymph node biopsy: results of a multi-institutional prospective cohort study. *Surgery*. 2005 г., Т. 138, стр. 474–80.
118. Raja S, Ching J, Xi L, et al. Technology for automated, rapid and quantitative PCR or reverse transcription PCR clinical testing. *Clin Chem*. 2005 г., Т. 51, стр. 882–90.
119. Hughes SJ, Liqiang X, Gooding WE, et al. A quantitative reverse transcription PCR assay for rapid, automated analysis of breast cancer sentinel lymph nodes. *J Mol Diagn*. 2009 г., Т. 11, стр. 576–82.
120. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007 г., Т. 13, стр. 4807–16.
121. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 г., Т. 28, стр. E63.
122. Visser M, Jiwa M, Horstman A, et al. Intra-operative diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer*. 2008 г., Т. 122, стр. 2562–7.
123. Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, et al. ne-step nucleic acid amplification—a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch*. 2009 г., Т. 454, стр. 203–10.

124. Backus J, Laughlin T, Wang Y, et al. Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. *J Mol Diagn.* 2005 г., Т. 7, стр. 327–36.
125. Zehenter BK, Dillon DC, Jiang Y, et al. Application of a multigene RT-PCR assay for the detection of mammoglobin and complementary transcribed genes in breast cancer lymph nodes. *Clin Chem.* 2002 г., Т. 48, стр. 1225–31.
126. Yun K, Gunn J, Merrie AE, et al. Keratin 19 mRNA is detectable by RT-PCR in lymph nodes of patients without breast cancer. *Br J Cancer.* 1997 г., Т. 76, стр. 1112–3.
127. Yoshimura G, Sakurai T, Oura S, et al. Evaluation of axillary lymph node status in breast cancer with MRI. *Breast Cancer.* 1999 г., Т. 6, стр. 249–58.
128. Tafe LJ, Schwab MC, Lefferts JA, et al. A validation study of a new molecular diagnostic assay: the Dartmouth-Hitchcock Medical Center experience with the GeneSearch BLN assay in breast sentinel nodes. *Exp Mol Pathol.* 2010 г., Т. 88, стр. 1–6.
129. Blumencranz P, Deck KB, Whitworth PW, et al. Clinical evaluation of a molecular assay for the detection of metastases in breast sentinel lymph nodes. *Arch Pathol Lab Med.* 2006 г., Т. 130, стр. 1362.
130. Blumencranz P, Pieretti M, Hasad H, et al. Quantitative intra-operative RT-PCR assay predicts size of sentinel nodemetastases. *Cancer Res.* 2009 г., Т. 69(Suppl), стр. 1012.
131. Komenaka IK, Torabi R, Nair G, et a. Intraoperative touch imprint and frozen section analysis of sentinel lymph nodes after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Ann Surg.* 2010 г., Т. 251, стр. 319–22.
132. S. Vidal-Sicart, P. Paredes, G. Zanón et al. Added value of intraoperative real-time imaging in searches for difficult-to-locate sentinel nodes. *Journal of Nuclear Medicine.* 2010 г., Т. 51, 8.
133. Peter Olcott, Guillem Pratx et al. Clinical evaluation of a novel intraoperative handheld gamma camera for sentinel lymph node biopsy. *Physica Medica.* 2013 г., Т. 5, 7, стр. 1-6.
134. Subramaniam DS, Isaacs C. Utilizing Prognostic and Predictive Factors in Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol.* 2005 г., Т. 6, стр. 147-159.

135. Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. *The Oncologist*. 2004 г., Т. 9, стр. 606-616.
136. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010 г., Т. 17, стр. R245-R262.
137. Ly A, Lester SC, Dillon D. Prognostic factors for patients with breast cancer: traditional and new. *Surg Pathol*. 2012 г., Т. 5, стр. 775-785.
138. Fasching PA, Heusinger K, Haberle L, Niklos M. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011 г., Т. 11, стр. 486.
139. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Hortobágyi GN. Clinical Application of cDNA Microarrays in Oncology. *The Oncologist*. 2003 г., Т. 8, стр. 252-258.
140. Oldenhuis CNAM, Oosting SF, Gietema JA. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *European Journal of Cancer*. 2008 г., Т. 44, стр. 946-953.
141. Hefti MM, Hu R, Knoblauch NW, Collins LC. Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Research*. 2013 г., Т. 15, стр. R68.
142. O. R. Brouwer, L. Vermeeren, I. M. van der Ploeg, et al. Lymphoscintigraphy and SPECT/CT in multicentric and multifocal breast cancer: does each tumour have a separate drainage pattern?: results of a Dutch multicentre study (MULTISENT). *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2012 г., Т. 39, 7, стр. 1137–1143.
143. R. A. Valdés Olmos, S. Vidal-Sicart, and O. E. Nieweg. SPECT-CT and real-time intraoperative imaging: new tools for sentinel node localization and radioguided surgery? *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 2009 г., Т. 36, 1, стр. 1–5.
144. PE, Lønning. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? *Ann Oncol*. 2007 г., Т. 18, стр. viii3-viii7.
145. Tonini G, Fratto ME, Schiavon G. Molecular prognostic factors: clinical implications in patients with breast cancer. *Cancer Therapy*. 2008 г., Т. 6, стр. 773-782.
146. M.A., Khan. Effect of preoperative intravenous steroids on seroma formation after modified radikal modifaed masectomy. *Ayub Med Coll Abbottabad*. 2017 г., Т. 29, 2.

147. Senkus E, Kyriakides S, Penault-Llorca FP. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and followup. *Annals of Oncology*. 2013 г., Т. 24, стр. 7-23.

148. Weaver, Donald L. Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. *Modern Pathology*. 2010 г., Т. 23, стр. S26–S32.

149. Detection of circulating mammary carcinoma cells in the peripheral blood of breast cancer patients via a nested reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for mammaglobin mRNA. Zach O, Kasparu H, Krieger O, Hehenwarter W, Girschikowski M. 17, 1999 г., *J Clin Oncol*, стр. 2015-2019.